



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

**Desenvolupament i validació d'un
mètode d'anàlisi per a la
determinació de compostos
bioactius en vegetals per HPLC**

Treball de Fi de Grau

Grau de Química

Tutora acadèmica: Maria Soledad Larrechi García

Tutora professional: Patricia Puig Guiral Alumne:

Julián Segura Rodríguez

Curs 2019-2020

Índex

Resum:	2
Abstract:.....	2
Objectiu:.....	3
Introducció:	3
Part experimental:.....	8
Optimització de la separació cromatogràfica:	9
Optimització de l'extracció:	11
Procediment d'extracció òptima:	14
Identificació de compostos:.....	14
Recta de calibratge:	15
Validació del mètode:	16
Especificitat/selectivitat:	16
Precisió:	16
Linealitat:	16
Recuperació:.....	16
LOD i LOQ:	17
Resultats i discussió:.....	17
Optimització de la separació cromatogràfica:	17
Optimització de l'extracció:	24
Identificació dels pics:.....	32
Matriu A:.....	32
Matriu B:.....	34
Matriu C1:.....	35
Matriu C2:.....	37
Matriu D:.....	39
Validació del mètode:	40
Selectivitat:	40
Linealitat:	40
Precisió:	41
Recuperació:.....	42
LOD i LOQ:	43
Conclusions (català):	45
Conclusions (English):.....	46
Bibliografia:	47

Resum:

La indústria d'alimentació animal ha estat investigant diferents compostos bioactius amb característiques antioxidants, antivirals y antimicrobians per tal de reduir l'ús d'antibiòtics en les mescles alimentàries i així evitar resistències antimicrobianes i generació de bacteries multiresistents. Els vegetals són fonts riques en compostos bioactius com per exemple: àcids fenòlics, flavones, flavanones, flavanols i en alguns casos, limonoides. En el present treball, s'ha desenvolupat i validat un mètode d'anàlisi per a la determinació d'aquests compostos polifenòlics en quatre matrius vegetals. Les matrius han estat tractades amb etanol a un equip ASE (*accelerated solvent extraction*) per tal d'extraure aquests compostos bioactius. L'anàlisi s'ha dut a terme mitjançant cromatografia líquida, HPLC, amb un detector DAD (diode array detector) seguit d'un MS (TOF, time of flight). El mètode ha estat validat d'acord amb els requeriments per nous mètodes que inclou selectivitat/especificitat, linealitat, precisió, límit de detecció i límit de quantificació.

Abstract:

Animal nutrition industry has been investigating different bioactive compounds which have antioxidant, antiviral and antimicrobial characteristics in order to reduce the use of antibiotics in nutrition mixtures, and then avoid antimicrobial resistances and also avoid multiresistant bacteria generation. Vegetables are rich sources of bioactive compounds, in particular, phenolic acids, flavones, flavanones, flavanols and, in some cases, limonoids. In this work, a method was developed and validated for determination of these polyphenolic compounds from four vegetable matrices. All samples were treated with ethanol using ASE (*accelerated solvent extraction*) as an extractor to extract these bioactive compounds. Analyses were performed by liquid chromatography, HPLC, using DAD (diode array detector) and MS (TOF, time of flight) as a detector. This method was validated according to the requirements for new methods, which include selectivity, linearity, precision and accuracy, limit of detection and limit of quantitation.

Objectiu:

El principal objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode analític mitjançant tècniques analítiques cromatogràfiques per a la determinació i quantificació dels dos grups de compostos bioactius majoritaris de quatre matrius vegetals, obtenint així, un total de vuit compostos polifenòlics a determinar (àcid cafèic, quercetina, hesperidina, eriocitrina, apigenina, luteolina, kaempferol, i limonina). Un cop desenvolupat el mètode, l'objectiu serà la validació d'aquest, tenint en compte els següents factors: especificitat/selectivitat, precisió, linealitat, recuperació, límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ).

Introducció:

Degut a l'augment de la preocupació social sobre els additius químics a la indústria agroalimentària, es pretén estudiar compostos bioactius procedents de fonts naturals, com per exemple dels vegetals. Aquests compostos han de tindre propietats favorables per a millorar la salut animal. Un exemple són els polifenols, presents en diversos vegetals i fruites, amb diverses propietats beneficioses per a millorar la salut de l'animal. La majoria de vegetals són rics en compostos bioactius. Aquests compostos tenen unes funcions específiques dintre del organisme que promouen una bona salut¹⁻³.

En l'indústria de l'alimentació animal han aparegut com a nous reptes la necessitat de reduir l'addició d'antibiòtics, degut al perill d'aparició de resistències antimicrobianes i generació de bacteries multiresistents. Una de les alternatives són els additius basats en extractes de vegetals que contenen compostos bioactius amb característiques antimicrobianes, antivirals, antioxidants i antiinflamatoris, posseeixen propietats antial·lèrgiques i antiulceroses, i tenen la capacitat d'inhibir l'agregació plaquetària¹⁻².

Dels compostos bioactius, aquest treball es centra en polifenols i limonoides ja que són els compostos bioactius predominants a les matrius vegetals objecte d'estudi al laboratori *APSA R&D* de l'empresa Andrés Pinaluba, S.A. on s'ha portat a terme el present treball.

Els polifenols són un ampli grup de compostos que es divideixen en subgrups depenent de la seva estructura: flavonols, flavanones, flavones, àcids fenòlics, etc. Tots ells tenen

estructures similars on la posició del grup alcohol determinarà molts cops el tipus i funció de la molècula. A la natura, aquests compostos es troben principalment en forma de glucòsid^{1,2,4}. La figura 1 mostren les molècules dels principals polifenols en els quals es basarà aquest treball. Aquests compostos han estat seleccionats a partir d'un estudi bibliogràfic previ, on s'ha cercat quins compostos bioactius són més beneficiosos i quins són majoritaris en els diferents vegetals en estudi.

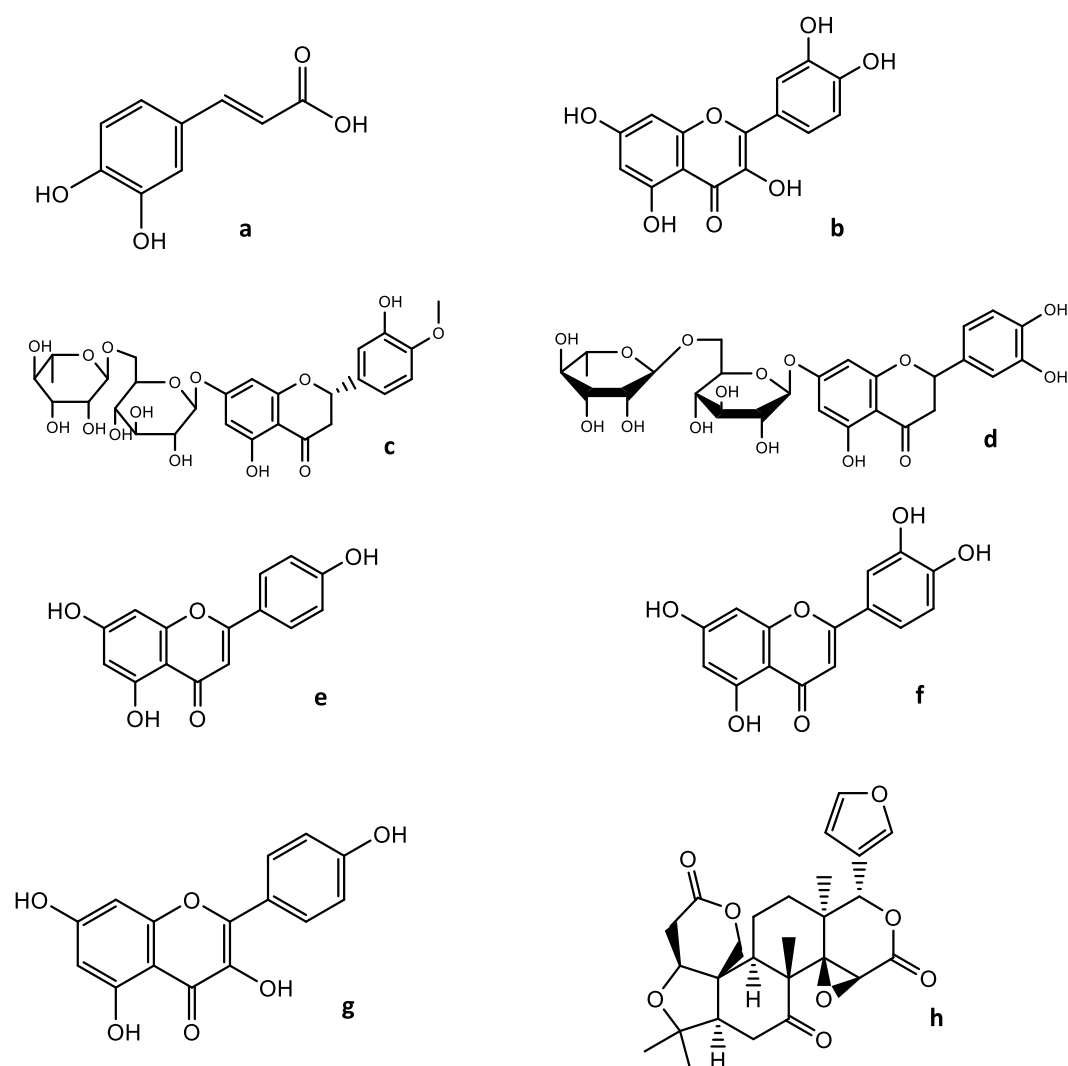


Figura 1. Estructura de les molècules d'estudi. Principals flavonoides i limonoide (limonin) de les diferents matrius: a) àcid cafèic, b) quercetina, c) hesperidina, d) eriocitrina, e) apigenina, f) luteolina, g) kaempferol, h) limonina.

El fet de que aquests compostos es trobin en forma de glucòsid tendeix a dificultar la identificació en l'etapa del seu anàlisi ja que per exemple si s'empra una tècnica cromatogràfica com és el cas que es presenta en el treball, aquests no sortiran al mateix temps de retenció que els patrons utilitzats. Així mateix, sol ser més complexa la

identificació al masses degut a que existeixen diferents glucòsids per a un sol compost tal i com es mostra a la figura 2, tots ells amb el mateix pes molecular i el mateix número d'àtoms^{1,2}. Només diferencia aquests isòmers estructurals la posició del sucre, fet que dificulta la seva identificació⁴.

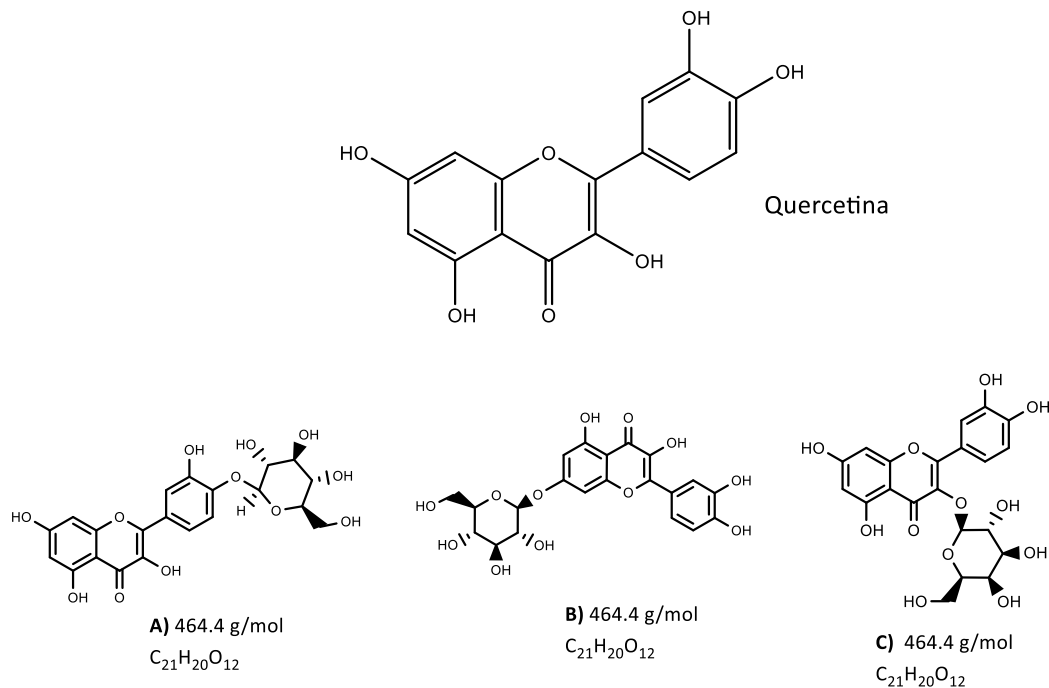


Figura 2. Diferents glucòsids de la quercetina. A) Quercetina 4'-glucòsid, B) Quercetina 7-O-glucòsid, C) Quercetina 3-galactòsid

En el present treball, per a analitzar aquests compostos orgànics s'utilitzaran mètodes cromatogràfics, a partir dels quals es podran separar dins a la columna en base a les característiques de solubilitat de cada analit en la fase mòbil, o també expressat com la polaritat de cada compost. Com que no són compostos volàtils, ni macromolècules, es decideix desenvolupar el mètode per cromatografia líquida. Els analits interaccionaran amb la fase mòbil (que tindrà unes característiques pròpies de polaritat) i amb la fase estacionària que serà de fase inversa, és a dir, apolar (C-18)⁵.

En general les fases mòbils de HPLC han de tenir gran puresa física (sense partícules, bombolles o oxigen), gran puresa química (sense contaminants), els analits han de ser-hi solubles, han de ser poc viscoses per així afavorir el pas per la columna sense generar pressions elevades, han de ser químicament inerts per no reaccionar amb els analits i han de ser compatibles amb el detector.

La solubilitat dels analits a la fase mòbil ve determinada per les següents atraccions: dipol-dipol, dipol induït, de dispersió i pont d'hidrogen. Així doncs segons la naturalesa

química de cada analit nombrat anteriorment, tindrà diferent interacció amb la fase mòbil. Aquesta diferència de solubilitat o polaritat de cada analit, serà la determinant a l'hora d'aconseguir una bona separació cromatogràfica⁴.

El detector DAD (diode array detector) permet detectar l'absorció dels analits en una regió de UV-vis. On el detector de UV-vis només treballa a una longitud d'ona, el DAD té múltiples fotodíodes per obtenir informació per un rang de longituds d'ona al mateix temps⁴.

El ESI (electrospray ionization) es un ionitzador on entren els analits dissolts en el solvent o fase mòbil, on s'ionitzaran en un capil·lar carregat. Degut a la repulsió de les càrregues es formarà un aerosol altament carregat. Les molècules d'analit es van aproximant entre elles, es repelen i quan aquesta repulsió venç la tensió superficial, esclaten les gotes. Aquest procés es repeteix fins que els analits estan lliures del solvent i en forma de ions, que passaran al detector TOF.

Un cop aquests ions entren al detector de masses, es separaran per pesos moleculars.

Els ions més petits viatjaran més ràpid pel tub de vol i seran els primers en arribar al detector, els més grans romandran més temps al tub de vol i arribaran al detector a temps més llargs.

El mètode parteix des de zero, per tant s'han de fixar unes condicions cromatogràfiques inicials que després s'hauran d'optimitzar. Es fa a partir d'un estudi bibliogràfic (articles sobre mètodes d'anàlisi de flavonoides en qualsevol matriu) i a partir de coneixements bàsics sobre cromatografia i sobre la naturalesa química dels analits a estudiar.

A l'estudi bibliogràfic previ es busquen articles que utilitzin condicions i equips similars i s'adopten les seves condicions inicialment, per exemple, articles que utilitzen columnes de dimensions similars, s'adopta el flux que fan servir⁶⁻⁸, entre altres característiques cromatogràfiques. Per a saber quina longitud d'ona fer servir, es busquen també articles que analitzin els mateixos compostos (hesperidina, eriocitrina, luteolina, apigenina, kaempferol, àcid cafèic, quercetina i limonina) i treballin amb detector DAD, es mira a quina longitud d'ona treballen^{9-10,13,18-21}. S'estudia també la metodologia d'extracció més comú per aquests compostos en vegetals.

Es treballa amb matrius vegetals complexes, per tant s'haurà de fer un tractament de la mostra per a deixar-la en condicions òptimes per a ser punxada a l'equip cromatogràfic.

S'estudien diferents mètodes d'extracció de matrius sòlides. Al laboratori *APSA R&D*, es disposa d'un equip ASE (*accelerated solvent extraction*), per tant el tractament de la mostra estarà enfocat en optimitzar el mètode d'extracció ASE.

L'extracció per ASE ofereix avantatges molt significatives com per exemple: fàcil automatització, anàlisis de mostres més ràpides, millor repetibilitat, menys requeriment de solvent orgànic, menys risc a la exposició als solvents i millor conservació de les mostres a estar exposades a la llum i a l'oxigen. A més, els sistemes d'extracció accelerada també permeten a l'operador a controlar la temperatura, pressió, temps d'extracció i número d'extraccions, que poden incrementar la quantitat de compostos extrets del vegetal quan s'optimitza⁵.

El ASE és un mètode d'extracció de matrius sòlides o semisòlides. El procés utilitza pressions elevades, fet que implica temps d'extracció més curts, menys despesa de solvent orgànic, treballar a temperatures moderades i la possibilitat d'obtenir millors percentatges de recuperació comparat amb altres mètodes convencionals que utilitzen condicions de temperatura i pressió més moderades. La temperatura elevada facilita l'extracció dels analits d'interès i les altes pressions ens permeten treballar a aquestes altes temperatures amb els solvents en estat líquid. Així doncs s'aconsegueix obtenir recuperacions elevades en temps curts d'extracció en un procés fàcilment automatitzable.

Com qualsevol mètode analític, s'ha de validar. La validació del mètode compren l'avaluació de: precisió (inter dia i intra dia), linealitat (R^2), especificitat/selectivitat, recuperació, límits de detecció (LOD) i límits de quantificació (LOQ).

El treball s'ha desenvolupat al laboratori *APSA R&D* de l'empresa Andrés Pintaluba, S.A. Andrés Pintaluba, S.A. és una empresa situada a Reus. Des de 1978, data que coincideix amb l'augment de l'activitat ovípara a la ciutat, l'empresa es dedica a fabricar i comercialitzar additius i mescles per a l'alimentació animal. Enfocats a una millora de la dieta i salut animal.

En aquest departament d'investigació *APSA R&D* es duen a terme tasques d'investigació i desenvolupament d'ingredients bioactius i additius des de el punt de vista de la seva identificació, demostració i validació de la seva eficàcia i de la seva influència en el desenvolupament de l'animal.

Part experimental:

El mètode s'ha desenvolupat en un cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC) acoblat amb un detector de díodes en línia, DAD (diode array detector) i un detector d'espectrometria de masses de temps de vol (TOF) amb font de ionització dual ESI (electrospray ionization).

La columna que s'ha escollit ha sigut una Zorbax Eclipse Plus-C18 150x2,1 mm 3,5 µm, les mides han estat escollides a partir de la valoració de diferents articles bibliogràfics i de la disposició al laboratori APSA R&D. S'ha utilitzat una precolumna Zorbax Eclipse Plus-C18 12,5x2,1 mm 5 µm per tal de protegir la columna ja que es treballa amb matrius complexes i la mostra punxada pot contenir petites partícules que poden anar danyant la columna, d'aquesta manera, si es punxen partícules, aquestes danyaran la precolumna, protegint així l'estat de la columna.

El mètode es desenvolupa per analitzar els següents compostos: àcid cafèic, quercetina, hesperidina, eriocitrina, apigenina, luteolina, kaempferol, i limonina en quatre vegetals diferents. Per temes de confidencialitat amb l'empresa, als diferents vegetals se'ls nombrarà com A, B, C1, C2 i D. On C1 i C2 són dos vegetals de la mateixa família però una és de varietat *longifolia* i l'altre varietat *capitata*.

Inicialment s'utilitzen 6 patrons de diferents flavonoides i compostos fenòlics (àcid cafèic, hesperidina, eriocitrina, apigenina, luteolina i kaempferol) escollits a través d'un estudi bibliogràfic⁷⁻¹⁰. Després, des de l'empresa es troba interessant treballar amb dos patrons més, incloent un limonoide i un altre flavonoide (limonin i quercetina).

A la taula 1 s'especifiquen els patrons, la família de compostos a la qual pertanyen i la seva puresa.

Taula 1. Llistat de patrons utilitzats.

Patró	Puresa	Família
Hesperidina	98.5 %	Flavanones (flavonoids)
Eriocitrina	98 %	Flavanones (flavonoids)
Luteolina	99 %	Flavones (flavonoids)
Apigenina	99 %	Flavones (flavonoids)
Kaempferol	99 %	Flavonols (flavonoids)
Quercetina	95 %	Flavonols (flavonoids)
Àcid cafèic	99 %	Àcids Polifenòlics
Limonina	95 %	Terpens

A continuació, un llistat de les característiques de perillositat i precaucions dels diferents reactius/solvents/patrons utilitzats:

Polifenols: No existeix perill en quant a la toxicitat, transport o manipulació. Emmagatzemar en fred per perill a descomposició.

Metanol: Fàcilment inflamable. Tòxic per inhalació, per ingesta y en contacte amb la pell. Tòxic: perill d'efectes irreversibles molt greus per inhalació, contacte amb la pell o ingesta.

Àcid fòrmic: Líquids i vapors inflamables. Nociu en cas d'ingesta. Provoca cremades greus a la pell i lesions oculars greus. Tòxic en cas d'inhalació.

Acetonitril: Nociu en cas d'ingesta, contacte amb la pell o inhalació. Provoca irritació ocular greu. Mantenir lluny de fonts de calor, espurnes, flama oberta o superfícies calentes. Portar guants de protecció/peces de protecció.

Etanol: Líquid y vapors molt inflamables. Mantenir lluny de fonts de calor, espurnes, flama oberta o superfícies calentes. Portar guants/ulleres/màscara de protecció.

Optimització de la separació cromatogràfica:

El mètode parteix des d'un punt inicial zero on només s'ha seleccionat el cromatògraf de treball i la columna, per tant, el següent pas serà l'optimització de la separació on es decidirà quines seran les condicions més favorables per a obtenir una bona separació i amb les quals es treballarà. Es considera un pas clau per a la determinació d'aquests compostos mencionats anteriorment. L'objectiu principal de l'optimització és obtenir cromatogrames amb bona resolució (pics separats) i bona eficàcia (pics estrets), amb temps d'anàlisi no molt llargs.

Primerament s'ha de decidir quin o quins solvents es faran servir a la fase mòbil. La tria dels solvents que s'utilitzaran inicialment es basa en articles bibliogràfics, a partir d'aquest punt, s'anirà variant la composició de la fase mòbil en funció dels cromatogrames resultants ja que es coneix la naturalesa química dels patrons i les interaccions que tenen amb la fase mòbil, és a dir, a partir de la seva polaritat es podrà saber si es quedaran més o menys retinguts a la fase estacionaria.

Com que els analits utilitzats són solubles en orgànics polars, es comença a plantejar la separació amb una columna de fase inversa i amb fases mòbils de solvents orgànics polars, així com mescles de metanol o acetonitril amb aigua¹¹⁻¹⁵.

Un cop triats els solvents, també s'ha de decidir altres condicions cromatogràfiques com: volum d'injecció, flux, temperatura de la columna, longitud d'ona del detector (DAD) i tots els paràmetres del MS com la font de ionització, i el mode de ionització (negatiu o positiu), la temperatura del gas, la pressió i flux del gas, el rang de masses, les masses de referència, entre d'altres.

El software amb el qual treballa el cromatògraf és: *"Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition"* i és amb el qual es modifiquen tots aquests paràmetres mencionats anteriorment.

Inicialment es fixen dues longituds d'ona: 360 nm i 210 nm, degut a que principalment absorbeixen a aquestes longituds. Després s'observa que els compostos mostren una absorció més elevada a 280 nm que a 360 nm, es fixen doncs les longituds d'ona de treball 280 nm i 210 nm.

El flux inicial serà de 0.25 mL/min^{12,16,17}.

El volum d'injecció serà de 5 µL, la temperatura de la columna serà de 30°C. A continuació es mencionen altres paràmetres cromatogràfics que es fixen a l'inici del mètode:

DAD (paràmetres):

Stop time: As pump/injector. Post time: Off. Peak width: >0.10 min (2'0s). Spectrum range: 190 nm. To: 400 nm. Step: 2 nm. Analog output: Zero offset: 5%, Attenuation: 1000 mAU. Required lamps: UV, vis. Autobalance: prerun. Margin for negative absorbance: 100 mAU. Slit: 4 nm. Delay: 0 min.

TOF (paràmetres):

Font d'ionització: Dual ESI. Mode d'ionització: Negatiu. Temperatura del gas: 325°C. Flux del nitrogen: 10 L/min. Pressió del nebulitzador: 60 psig. Fragmentor: 150 V. Skimmer: 65 V. OCT 1 RF Vpp: 250 V. Voltatge de la Dual ESI: 3000 V. Rang de masses: 115-1000 m/z. Masses de referència: 119.036 m/z y 966.0007 m/z. Time: 1000 ms/spectrum. Rate: 1 spectra/s. Ref. nebulizer: 5 psig.

Es treballarà amb una solució que conté tots els patrons a 25 ppm en metanol.

Un cop fixades les condicions cromatogràfiques inicials, es proposa un primer gradient de fase mòbil si no s'arriba a una separació clara i amb bona resolució dels patrons amb el primer gradient proposat, s'inicia un procés que consisteix en canviar la composició de la fase mòbil i el gradient per afavorir la separació dels pics.

Els patrons utilitzats tenen millor solubilitat en el dissolvent orgànic, per tant, si s'augmenta el percentatge de solvent orgànic a la fase mòbil, seran més afins a aquesta i per tant eluiran més ràpid, si es vol separar els compostos, es buscarà que tardin més en eluir ja que així interaccionaran més temps amb la fase estacionaria i com que cada compost interacciona de manera diferent amb cada fase, s'obindrà una millor separació.

El número de grups funcionals que tinguin les diferents molècules definiran la seva polaritat, per exemple, l'àcid cafèic serà el compost més polar degut a que conté un àcid carboxílic que donarà certa polaritat a la molècula, després els compostos amb més grups alcohol seran els que tinguin una polaritat més elevada.

La estratègia que segueix aquest treball és, un cop s'obté un primer cromatograma amb el gradient inicial, mirar on són els problemes de resolució per així augmentar el temps amb un percentatge baix de solvent orgànic, a les regions del cromatograma on tardin en eluir compostos, s'augmentarà aquest solvent orgànic per reduir el temps d'anàlisi.

Es comença amb un 90% de A i 10% de B. I es va augmentant el % B fins a un 100% perquè acabin d'eluir tots els patrons.

Si no s'aconsegueix la separació, l'estratègia canvia a buscar un altre solvent amb una força d'elució diferent^{16,18,19,22-27}.

Com que es decideix incloure dos patrons més al mètode, s'haurà de comprovar si les condicions òptimes, també ho són un cop produït aquest canvi. En cas de que no siguin favorables, l'estratègia a seguir serà la mateixa.

Optimització de l'extracció:

Per a poder analitzar els compostos bioactius del vegetals seleccionats, hem de fer un tractament previ a les mostres per a extreure aquests compostos i poder punxar-los al cromatògraf de la manera més neta possible per no danyar l'instrument i per no tenir

interferències que puguin donar problemes quantitius, al MS es pot donar una supressió de la ionització si es punxen mostres brutes.

El primer pas que es fa quan es reben les matrius és separar les fulles del tall, ja que poden tenir concentracions diferents de compostos bioactius. S'utilitzarà el tall per a optimitzar el mètode. En algun cas, esmentat posteriorment, s'utilitza també la fulla.

Un cop separades el següent pas és homogeneïtzar-les amb una trituradora "Moulinex". Es tallen a trossos petits i es fiquen a la trituradora. S'obté una pasta que es porta a liofilitzar ja que són mostres amb un alt contingut d'aigua.

Com que es disposa d'un equip ASE, s'enfocarà a optimitzar l'extracció amb l'ASE i es compararà després amb altres tipus d'extraccions mencionades a la bibliografia. Es valorarà quina és millor comparant les àrees dels pics cromatogràfics ja que com es parteix de la mateixa quantitat de mostra, no farà falta calcular la recuperació, simplement qui tingui àrees més extenses serà qui tingui millor recuperació. També es valorarà el temps emprat per extracció.

Per a optimitzar l'extracció ASE de forma ràpida es proposa un disseny experimental, a la taula 2 s'especifiquen les condicions de cada experiment, on els paràmetres que influeixen principalment són el tipus de solvent i la temperatura ja que l'equip treballa a una pressió fixa i es comprova que un número de cicles major, amb l'augment de temps que comporta, no augmenta significativament la recuperació. Per tant tindrem un disseny de dos factors i dos nivells.

Taula 2. Disseny experimental per optimitzar l'extracció per ASE.

Experiment	Temperatura (°C)	Solvent
1	40	Metanol (80%)
2	80	Metanol (80%)
3	40	Etanol (80%)
4	80	Etanol (80%)

El procediment de l'extracció és el següent:

Primerament es pesa la mostra liofilitzada i homogeneïtzada a una cel·la de l'equip ASE, afegint terra diatomea (terra inert) per acabar d'omplir la cel·la, després es col·loca a l'equip ASE i s'espera a que s'extregui amb les condicions fixades.

Les condicions seran les següents: el número de cicles per mostra serà 1, la pressió de treball són 1500 psi, el static time estarà fixat a 12 min. Per últim, la temperatura i el solvent dependrà de quin assaig s'estigui fent.

Es poden col·locar fins a un màxim de 9 cel·les a la vegada. Per a cada cel·la el temps de treball de l'equip és d'aproximadament 30 min. S'ha de col·locar un blanc (terra diatomea) a la primera i última posició i entre mig de mostres procedents de diferent matriu.

A l'extracte final, s'elimina el solvent orgànic al rotavapor. Com que no tenim el solvent orgànic al 100 %, queden restes d'aigua. Es congela el resultat del rotavapor i un cop congelat es porta a liofilitzar, procés que pot durar més de 24 hores (depenent de la quantitat de mostra i d'aigua). Quan ja està liofilitzat, es dissol en aigua:acetonitril (90:10) si no es dissol totalment es porta a l'ultrasons 5 min. Finalment es centrifuga 5 min a 10000 rpm, es recull el sobrenedant i s'eliminen els sediments. El sobrenedant es punxa al cromatògraf.

Un cop es decideixen les condicions per l'ASE, es pensa que el % de solvent orgànic pot influir, així que també es prova amb 60% de solvent orgànic. Els resultats també es comparen a partir de les àrees dels pics cromatogràfics.

L'extracció per ASE es compara amb dos tipus més d'extraccions, que es fan referència a la bibliografia com a mètode principal d'extracció de polifenols en matrius vegetals^{8,12,18,26,28}. La primera afegeix solvent orgànic (metanol) a la mostra i es col·loca a l'ultrasons durant 30 min. La segona extreu amb etanol al 70% a temperatura de 50°C i amb agitació magnètica durant 2 hores.

Procediment de l'extracció a l'ultrasons:

Afegim mostra a un tub Falcon i afegim metanol al 100% (10 mL), es col·loca a l'ultrasons durant 30 min. Després es centrifuga i es recopila el líquid resultant. Amb el sediment es torna a afegir metanol 100% i es torna a deixar 30 min a l'ultrasons. Aquest procés es repeteix un total de tres vegades. Tot el líquid resultant es porta al rotavapor per eliminar el metanol. El sòlid que queda es dissol en una solució d'aigua:acetonitril (90:10) si no es dissol totalment es porta a l'ultrasons 5 min. Finalment es centrifuga 5 min a 10000 rpm per eliminar sòlids. El sobrenedant es punxa al cromatògraf.

Procediment de l'extracció per agitació magnètica:

Es pesa mostra en un vas i s'afegeix 50 mL etanol 70%, amb un agitador magnètic es porta a un bany a 50°C i es deixa 2 hores. Passades les 2 hores, es filtra i es guarda el líquid. Es porta al rotavapor per eliminar l'etanol. No s'eliminarà tot el líquid degut a que hi ha presència d'aigua. Es congela i es liofilitza. El sòlid final es dissol amb aigua:acetonitril (90:10), si no es dissol totalment es porta a l'ultrasons 5 min. Finalment es centrifuga 5 min a 10000 rpm per eliminar sòlids. El sobrenedant es punxa al cromatògraf.

Per a la matriu vegetal A, es fan tots els experiments per a definir quina és la opció més òptima. La matriu B, té característiques diferents a les matrius A, C i D, i per tant, a part d'extraure amb la òptima, es prova a fer per ultrasons també, degut a que es troba a bibliografia que és la principal opció^{8,9,18}. Per a les matrius C i D, l'extracció òptima correspondrà a l'òptima per A.

Procediment d'extracció òptima:

L'extracció òptima es farà a l'equip ASE. Es pesarà 1 gram de mostra per a les matrius A, C1, C2 i D (per a la matriu A es separa el tall de les fulles, s'utilitzarà el tall només). Per a la matriu B, es pesarà 10 mg degut a la alta concentració de polifenols d'interès (si es pesa 1 gram, surten pics fora de la recta de calibratge i molt alts produint-se altiplans als pics).

La deguda quantitat de mostra s'introdueix a les cel·les de l'equip juntament amb terra diatomea. S'extreu a condicions òptimes (etanol 80%, 40°C, 1 cicle).

S'evapora el solvent de l'extracte amb el rotavapor i liofilitzador. El sòlid resultant es dissol amb 1 mL de la solució H₂O:ACN (90:10). Tot seguit es centrifuga durant 5 min. A 10000 rpm i el sobrenedant es punxa al cromatògraf.

Identificació de compostos:

Un cop s'aconsegueix la separació cromatogràfica i l'extracció optimitzades, es procedeix a identificar els pics cromatogràfics amb el detector MS (TOF). Com que molts dels compostos que es volen quantificar no estan en la seva forma lliure sinó que estan en forma de glucòsid a les matrius, no surten al mateix temps de retenció que els patrons. Per a quantificar-los doncs, es farà identificant el pic del cromatograma del DAD

amb ajut del MS. Aquest pic corresponent a qualsevol glucòsid s'interpolerà a la recta de calibratge del patró corresponent lliure i s'expressarà el resultat en equivalents del polifenol lliure.

Per a identificar els compostos:

Obrir el software *"Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00"* i carregar l'arxiu del cromatograma. Extraure el cromatograma DAD a 280 nm (àcid cafeic, hesperidina, eriocitrina, luteolina, apigenina i kaempferol) i 210 nm (limonina i quercetina). Buscar compostos amb l'opció *"Find by molecular feature"*. Mirar que els pics ESI/TIC coincideixin amb els del DAD a temps de retenció (amb els patrons s'observa que hi ha una separació de 0.14 min entre pics ESI/TIC i DAD). Després *"Identify by data base"* i seleccionar els que tinguin un score elevat (a poder ser >80%). El valor de score indica el percentatge de semblança del espectre amb la base de dades de compostos del software. Per bibliografia, confirmar que el compost trobat es troba a la nostra matriu. Guardar la fórmula i la massa del compost, al pròxim anàlisi es pot buscar directament per massa i fórmula.

La identificació dels pics es fa de forma temptativa comparant la informació obtinguda amb el detector amb la base de dades disponibles del software utilitzat.

Recta de calibratge:

Els compostos es quantifiquen interpolant les àrees dels pics corresponents a la recta de calibratge construïda a partir de diferents concentracions de cada patró.

La recta de calibratge està feta en un interval de linealitat que inclou l'interval de linealitat de cada patró i conté els següents punts: 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm i 45 ppm. Es prova també 50 ppm però s'observa, a partir del valor de R^2 , que incloure el punt de 50 ppm disminueix la linealitat de la recta.

Com que no s'aconsegueix la separació dels pics corresponents a luteolina i quercetina es preparen de forma independent.

Es prepara una solució mare de cada patró de 1000 ppm. A partir d'aquestes solucions es prepara una solució intermèdia de 100 ppm que inclou tots els patrons a aquesta concentració. A partir d'aquesta solució intermèdia, es preparen les solucions de cada punt de la recta. Es preparen 3 solucions de cada punt de la recta.

Validació del mètode:

Per a la validació del mètode es valoraran diferents aspectes com: especificitat/selectivitat, precisió, linealitat, recuperació, límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ).

Especificitat/selectivitat:

Es valorarà de manera visual la resolució del cromatograma. Com de separats estan els pics. Com més separats, més selectiu serà el mètode.

Precisió:

Es faran 3 anàlisis un mateix dia i a diferents dies de tres nivells de concentració de cada patró (1 ppm, 25 ppm i 45 ppm), es calcula el %RSD, com més baix sigui aquest valor, més precís serà el mètode.

$$\%RSD = \frac{(s * 100)}{x}$$

Equació 1. Fórmula %RSD

S= desviació estàndard

X= mitjana

Linealitat:

Es valora la regressió lineal de la recta de cada patró. Cada recta de tots els patrons ha de tindre una $R^2 > 0.99$ per a poder ser vàlid. Com més pròxim sigui a 1, més lineal serà.

Recuperació:

Per a calcular la recuperació, es fortifica la mostra abans d'extreure-la, també s'extreu la mateixa mostra sense fortificar (blanc), al saber la concentració amb la qual s'ha fortificat tal com indica l'equació 2, es pot calcular el percentatge de recuperació seguint la fórmula de l'equació 1.

$$Recuperació = \frac{[mostra fortificada] - [mostra sense fortificar]}{[Fortificació]} \times 100$$

Equació 2. Fórmula utilitzada per a calcular la recuperació.

Per a la fortificació s'afegeixen 0.25 mL de la solució del mix de patrons de 100 ppm.

Per tant segons els càlculs següents, la concentració esperada de la fortificació és de 25 ppm.

$$0.25 \text{ mL} \times \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = 0.025 \text{ mg a sequetat}$$
$$\frac{0.025 \text{ mg}}{0.001 \text{ L}} = 25 \text{ ppm}$$

Equació 3. Càlcul de concentració de la fortificació.

LOD i LOQ:

Per a calcular els límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), es fan diverses dilucions de les diferents solucions de patrons. Es preparen solucions de 1 ppm, 0.5 ppm, 0.1 ppm, 0.01 ppm i 0.001 ppm. Al LOD es valora que el senyal, és a dir, l'alçada del pic, tingui una relació senyal : soroll igual o superior a 3. Al LOQ la relació senyal : soroll serà de 10. Aquella concentració que compleixi aquest requisit serà el LOD o LOQ. El propi software del cromatògraf calcula el valor de la relació senyal : soroll.

Resultats i discussió:

Optimització de la separació cromatogràfica:

Primerament només es va pensar en analitzar 6 compostos, per tant, la primera optimització es va fer d'aquests 6 patrons.

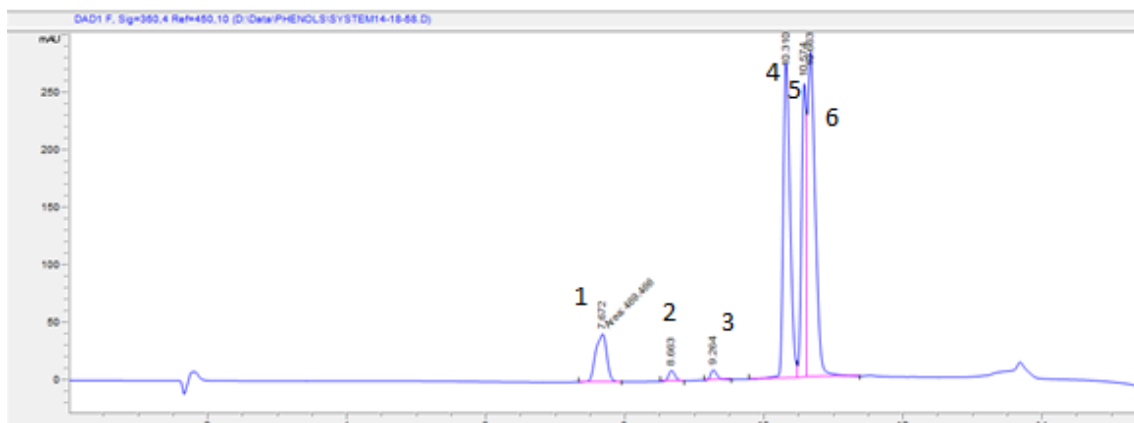
Inicialment es va optar per la següent fase mòbil: A: Aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic i B: Metanol amb 0,1% d'àcid fòrmic.

El primer gradient utilitzat es mostra a la taula 3. Aquest primer gradient es orientatiu, per a tindre una idea de com començar a optimitzar la separació, a partir d'aquest gradient es coneix a quin temps de retenció pot haver problemes de resolució o eficàcia (temps de retenció, separació entre pics i amplada). Primerament es va configurar el DAD amb longitud d'ona de 360 nm.

Taula 3. Primer gradient utilitzat par a la optimització de la separació.

Temps	%B	Flux (ml/min)
0	20	0.25
3	40	0.25
5	80	0.25
10	100	0.25
12	100	0.25
13	20	0.25
15	20	0.25

A la figura 3 es pot veure el cromatograma després d'aquest primer gradient proposat. Es pot observar que surten pics molt més grans que d'altres, això es degut a que no tots els compostos absorbeixen de forma òptima a 360 nm. També sobre $t_r=11$ min. es poden observar dos pics solapats.

**Figura 3.** Cromatograma dels patrons (1. Àcid cafèic, 2.Eriocitrin, 3.Hesperidin, 4. Luteolin, 5. Apigenin, 6. Kaempferol) del primer gradient proposat.

Per a solucionar aquest problema es proposa un altre gradient, el descrit a la taula 4, incrementant el temps amb el % B baix, ja que així, com que els nostres compostos no tenen tanta solubilitat a l'aigua com al metanol, interaccionaran més temps amb la fase estacionaria (apolar), i per tant sortiran a temps de retenció més grans. A més percentatge de solvent orgànic, més solubles seran, per tant eluiran més ràpid. Si el percentatge de solvent orgànic es deixa baix, els analits interaccionaran més amb la fase estacionària degut a que no seran tant solubles en la fase mòbil. També sortiran més separats. Augment de resolució.

Taula 4. Segon gradient proposat.

Temps	%B	Flux (ml/min)
0	20	0.25
2	40	0.25
12	80	0.25
22	100	0.25
27	100	0.25
30	20	0.25
32	20	0.25

Aquest cop, es pot observar a la figura 4 com s'ha millorat lleugerament la resolució, els últims pics estan més separats però encara no s'arriba al punt desitjat. Tampoc es veu molta eficàcia ja que els pics no són gaire estrets.

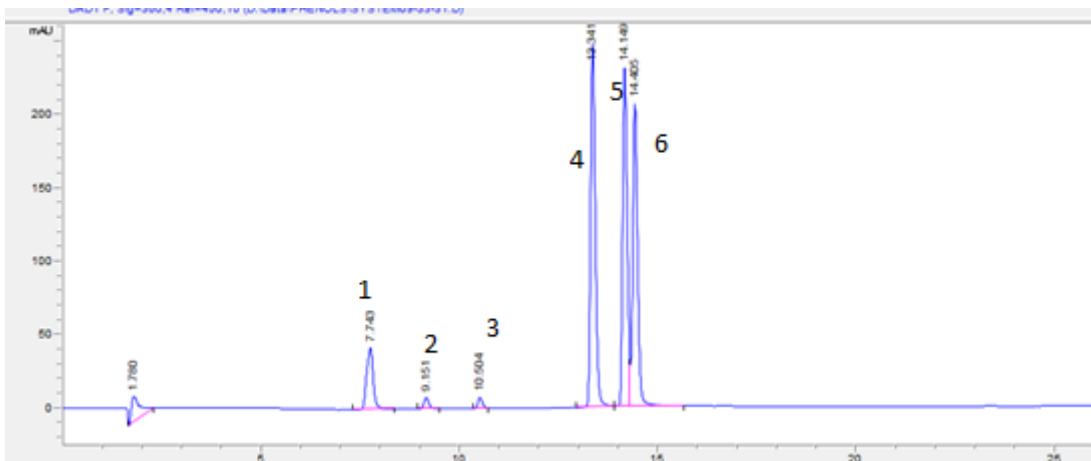


Figura 4. Segon cromatograma, millora de resolució respecte l'anterior (fig. 3) Patrons: 1. Àcid cafèic, 2.Eriocitrin, 3.Hesperidin, 4. Luteolin, 5. Apigenin, 6. Kaempferol.

Es proposa canviar la longitud d'ona, a bibliografia s'ha trobat que molts articles que analitzen aquests compostos treballen a 280 nm^{7,8,10,18,19,21,22}.

Es modifica també la fase mòbil a A: Aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic i B: Acetonitril amb 0,1% d'àcid fòrmic. L'acetonitril i el metanol tenen forces d'elució diferents per tant la interacció amb els analits serà diferent.

També es segueix modificant el gradient, augmentant encara més temps un %B baix tal i com es pot veure a la taula 5.

Taula 5. Tercer gradient proposat.

Temps	%B	Flux (ml/min)
0	20	0.25
5	40	0.25
15	60	0.25
25	65	0.25
35	70	0.25
36	100	0.25
40	100	0.25
41	20	0.25
45	20	0.25

A la figura 5 podem veure una clara millora respecte l'últim cromatograma degut al canvi de longitud d'ona, de fase mòbil i de gradient. Podem veure una molt bona eficàcia i resolució encara que els pics a $t_r=23$ es poden separar més.

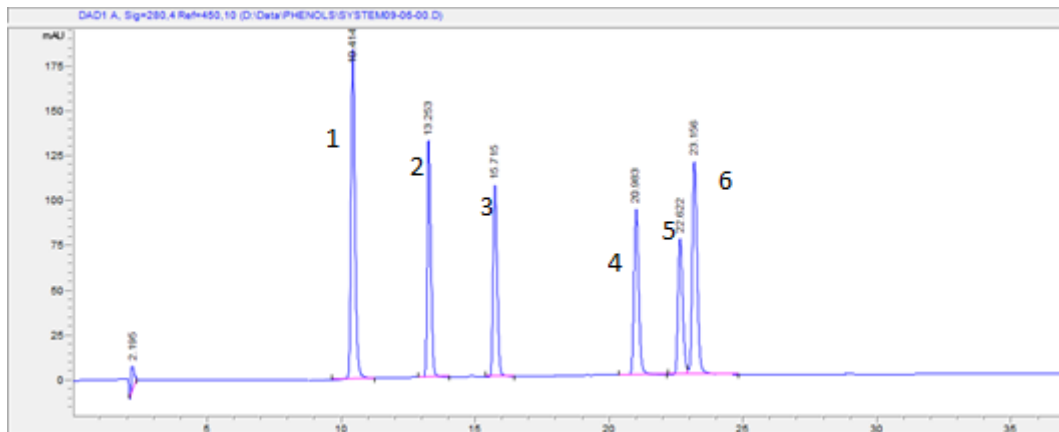


Figura 5. Cromatograma a 280 nm. Millor resolució i eficàcia. Patrons: 1. Àcid cafèic, 2.Eriocitrin, 3.Hesperidin, 4. Luteolin, 5. Apigenin, 6. Kaempferol.

Es proposa un últim gradient, taula 6, amb aquesta nova fase mòbil per acabar de separar els últims pics i obtindrà així un cromatograma amb molta resolució i eficàcia.

El temps que es deixa al final de l'anàlisi és per a tornar a condicionar la columna (quan es posa 100% de B es per acabar d'expulsar analits que encara quedin retinguts, quan es posa 10% de B es per a tornar a condicionar la columna a les condicions d'anàlisi inicials) i condicionar l'equip per a que s'estabilitzi la pressió, ja que es treballarà amb seqüència i ha d'estar a la pressió inicial per al següent anàlisi.

Taula 6. Gradient final.

Temps	%B	Flux (ml/min)
0	10	0.25
10	30	0.25
13	35	0.25
16	40	0.25
20	50	0.25
23	100	0.25
26	100	0.25
27	10	0.25
36	10	0.25

A la figura 6 es pot veure el cromatograma amb el gradient final, ja optimitzat tant en gradient com en composició de fase mòbil o longitud d'ona. S'ha aconseguit un cromatograma amb molt bona resolució i eficàcia, pics estrets i separats, permet integrar els pics de forma senzilla i acurada.

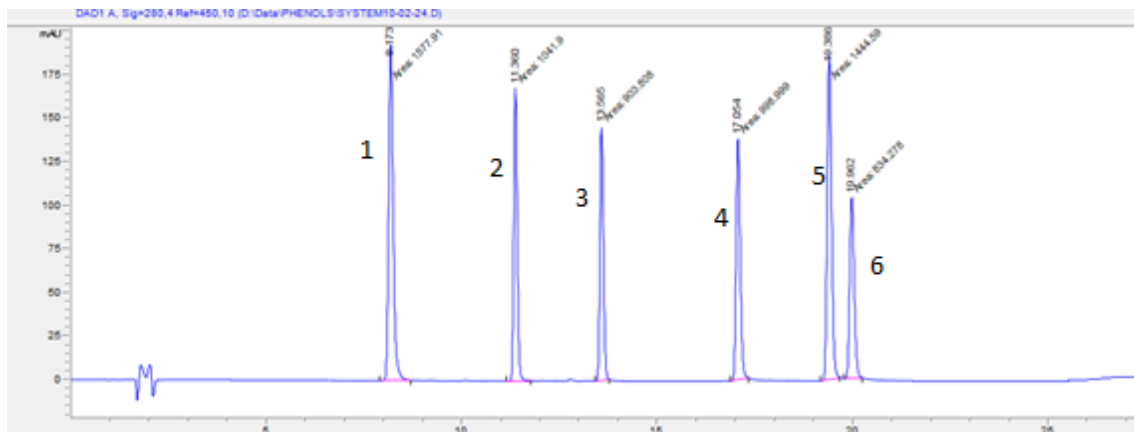


Figura 6. Cromatograma de la separació optimitzada després de canviar fase mòbil, gradient i longitud d'ona 280 nm. 1. Àcid cafèic, 2.Eriocitrin, 3.Hesperidin, 4. Luteolin, 5. Apigenin, 6. Kaempferol.

Posteriorment, es decideix modificar el mètode per a treballar amb dos patrons més (quercetina i limonina). Per tant, incloure dos patrons més suposa una nova optimització de la separació.

Es punxa un mix dels 8 patrons per veure com surten els pics. A la figura 7 es veu el cromatograma d'aquesta primera punxada amb les condicions optimitzades per a la separació dels 6 primers patrons.

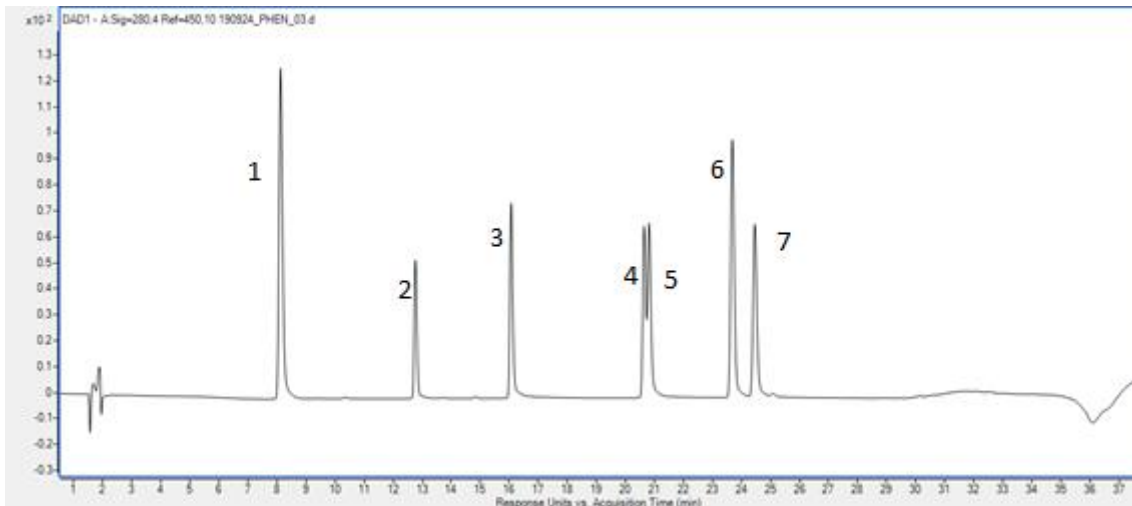


Figura 7. Cromatograma dels 8 patrons amb les condicions òptimes per als 6 primers patrons (1.Àcid cafèic, 2.Hesperidina, 3. Eriocitrina, 4. Luteolina, 5. Quercetina, 6. Apigenina, 7. Kaempferol).

Podem veure com només surten 7 pics i dos d'ells estan superposats al min. 21. Amb el MS identifiquem quins són aquests dos pics. Corresponen a la quercetina i a la luteolina. Amb el MS també s'observa un pic a $t_r = 29$ min. que correspon a la limonina, això ens indica que aquest compost no absorbeix a 280 nm. En aquest cromatograma no s'observa el pic de la limonina degut a que absorbeix a 210 nm. Per aquest compost es treballarà a aquesta longitud d'ona.

Primer s'intenta aconseguir la separació augmentant el temps d'anàlisi retardant la pujada de solvent orgànic sobre el temps de retenció 20 min. que és on hi ha el problema de solapament. Tal com es veu al cromatograma de la figura 8, no s'aconsegueix la separació

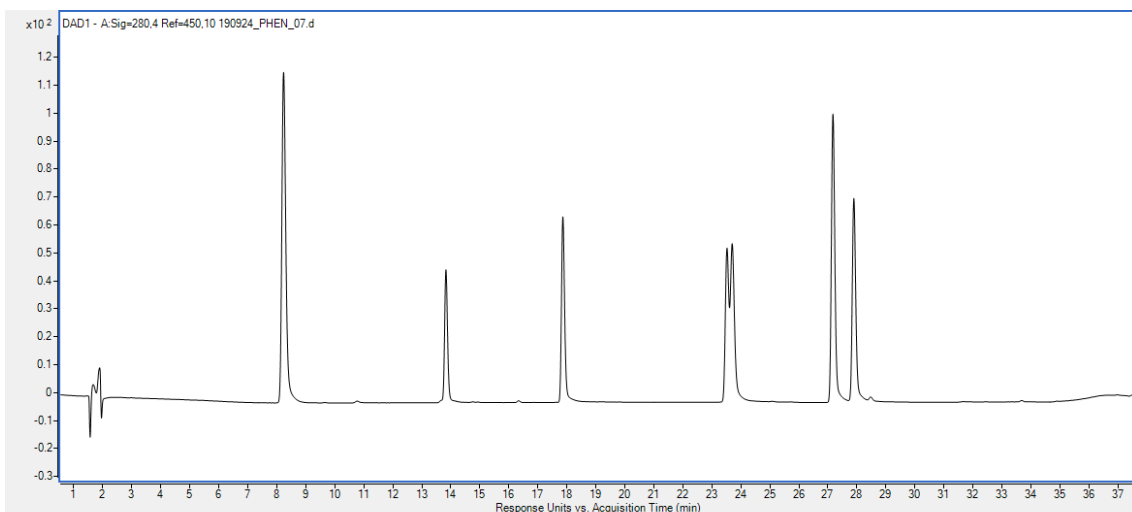


Figura 8. Cromatograma dels 8 patrons (àcid cafeic, hesperidina, eriocitrina, apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina i limonina) a 280 nm variant el gradient.

Per a solucionar el problema es planteja fer un canvi de flux i augmentar-lo fins a 0.350 mL/min, ja que si s'augmenta el flux, es guanya eficàcia ja que surten els pics més estrets. A la figura 9 es veu el cromatograma amb el nou flux, els pics surten més estrets però no s'arriba a aconseguir la separació de la quercetina i luteolina.

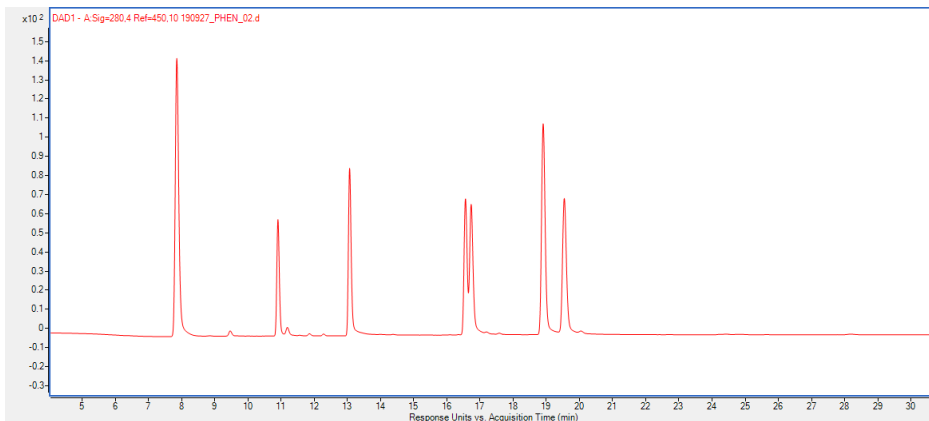


Figura 9. Cromatograma dels patrons augmentant el flux a 0.350 mL/min.

Es prova doncs a disminuir el flux a 0.200 mL/min. Tal com es mostra a la figura 10, tampoc es troba millora en disminuir el flux. Per tant, es decideix treballar a flux inicial i gradient de la separació optimitzada dels 6 primers patrons. A 210 nm, tal i com s'observa a la figura 10, tenim més senyal de la quercetina que a 280 nm, a més es veu el pic de la limonina. Es fixa 210 nm com a longitud d'ona de treball per aquests dos patrons.

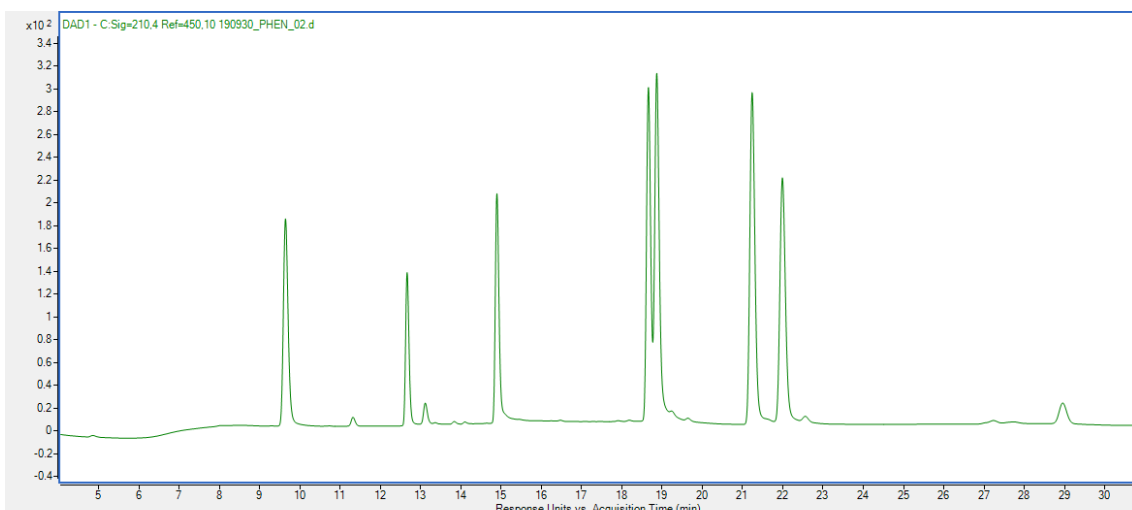


Figura 10. Cromatograma de patrons a 210 nm, disminuint el flux a 0.200 mL/min.

No s'aconsegueix separació cromatogràfica. Es decideix treballar amb solucions independents per a la luteolina y quercetina. No hauria de donar problemes degut a que

no s'esperen aquests compostos sense glucosilar en mostres reals. Així es podrà quantificar per DAD i es simplificarà el treball ja que el procés d'identificació i quantificació per MS és més complex.

El gradient final serà el que mostra la taula 6 a flux 0.25 mL/min.

Optimització de l'extracció:

Per a l'extracció, primerament s'optimitza el mètode per ASE, tal i com s'ha indicat a la taula 2, es proposa un disseny experimental amb el qual es decideix la temperatura de treball i el tipus de solvent (els dos principals paràmetres influents del ASE). L'ordre dels experiments es fa de manera aleatòria.

La comparació de temperatura i el solvent es va fer amb mostra fresca. Com que l'objectiu es comparar extraccions, es pot fer comparant cromatogrames, sense la necessitat de treballar amb mostra liofilitzada.

L'optimització de les condicions d'extracció amb l'ASE es fa amb el tall de la matriu A, posteriorment es compararà els diferents mètodes d'extracció amb el tall i la fulla.

A la figura 11 s'observen dos cromatogrames superposats per a poder visualitzar millor les diferències. De color lila correspon a l'extracció feta amb les condicions: 80°C, 80% etanol y el cromatograma negre amb les condicions: 40°C, 80% etanol.

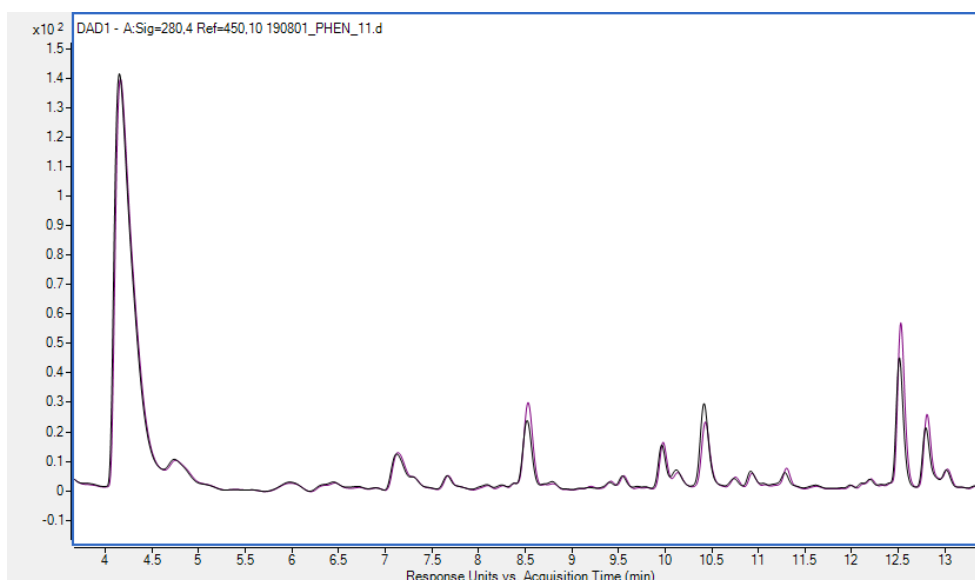


Figura 11. Cromatogrames de extraccions amb diferent temperatura. El cromatograma lila correspon a les extraccions a 80°C, el negre a extraccions a 40°C.

No s'observen diferències significatives, a la figura 12, s'observen els pics integrats molt similars.

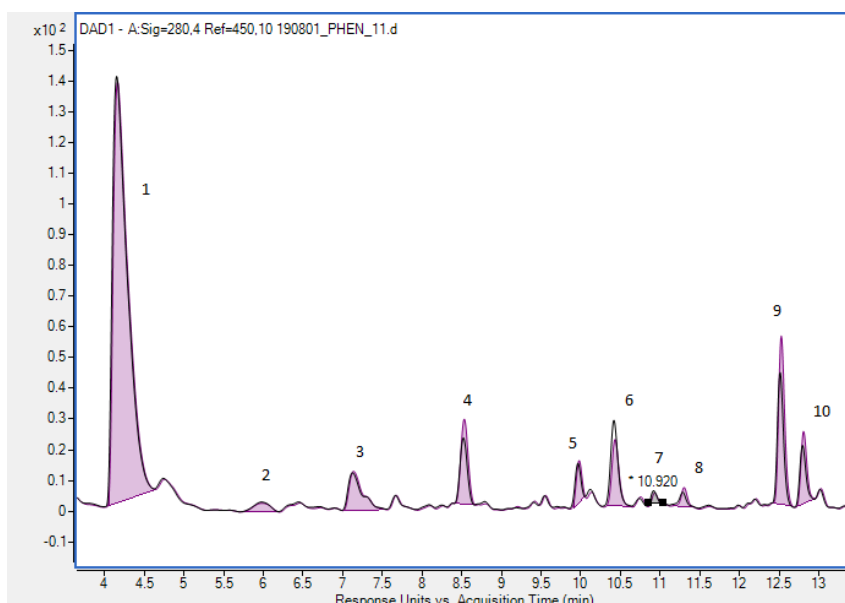


Figura 12. Cromatogrames integrats de extraccions amb diferent temperatura. El cromatograma lila correspon a les extraccions a 80°C, el negre a extraccions a 40°C.

A la taula 7 estan descrites les àrees corresponents als pics de la figura 12. Els pics 3, 4, 9 i 10 són més grans els que provenen de l'extracció a 80°C que a 40°C. No obstant, com no hi ha diferències significatives (no es considera significatiu un augment de 40 unitats, i només un pic supera aquest augment), s'opta per treballar a 40°C, evitant així, treballar a temperatures altes ja que depèn de la matriu pot arribar a degradar algun compost d'interès.

Taula 7. Àrees corresponents als pics de les extraccions amb diferent temperatura.

Temperatura		Pic									
Àrea	Cromatograma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	T° 80°C	1793	40	150	176	65	135	21	33	291	123
	T° 40°C	1820	43	131	136	57	174	19	19	229	100

Un cop definida la temperatura, es va passar a definir el solvent d'extracció. A la figura 13 podem veure dos cromatogrames superposats, el de color lila correspon a extraccions amb etanol i el de color negre correspon a extraccions amb metanol.

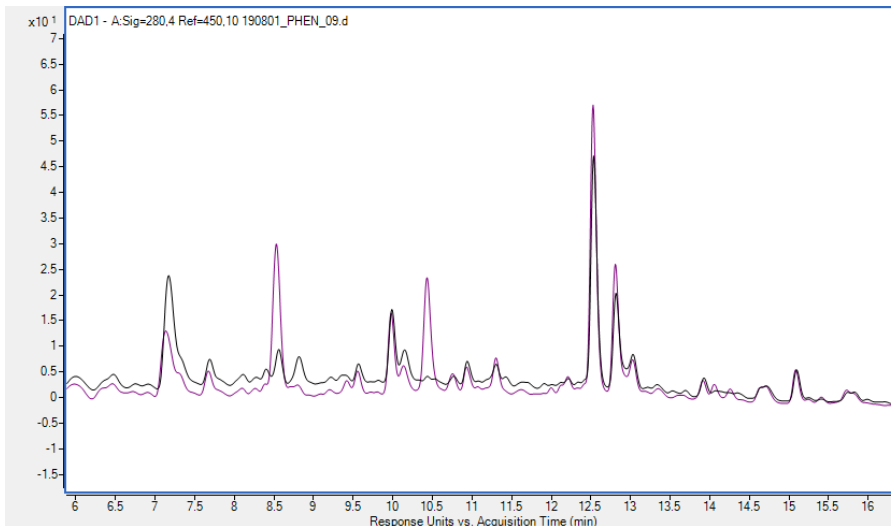


Figura 13. Cromatograma d' extraccions amb diferent solvent. El cromatograma negre correspon a extraccions amb metanol, el cromatograma lila a extraccions amb etanol.

En aquest cas sí que es veuen diferències significatives, on el cromatograma lila, en general, té pics més alts que el cromatograma negre. A la figura 14, els principals pics integrats.

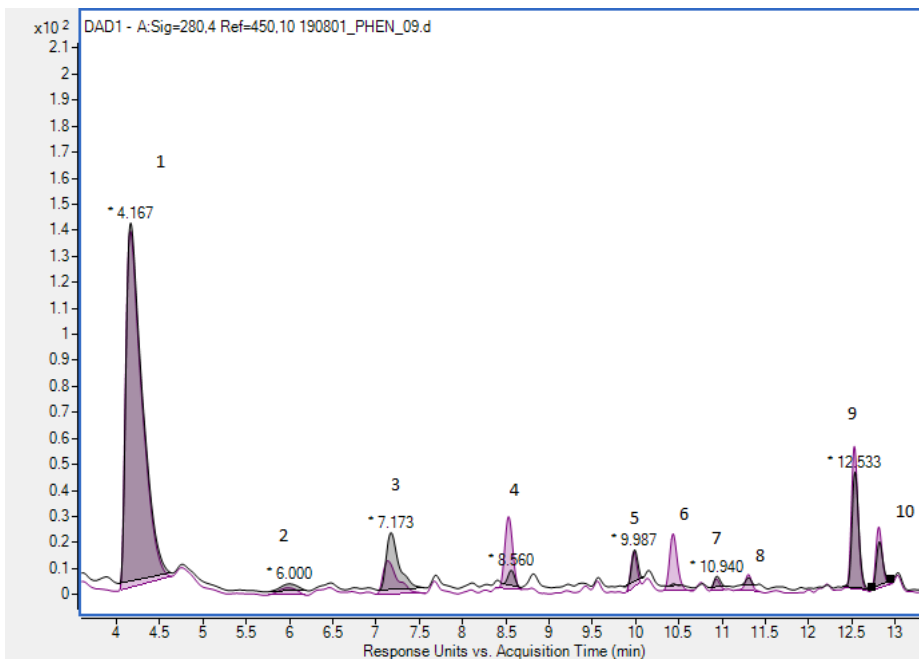


Figura 14. Cromatograma amb els pics principals integrats. El cromatograma negre correspon a extraccions amb metanol, el cromatograma lila a extraccions amb etanol.

Es pot concloure per àrea de pics que és més efectiu fer extraccions amb etanol que amb metanol, degut a que, com mostra la taula 8, els principals pics tenen l'àrea més gran fent servir etanol que amb metanol.

Tot i que el pic número 6 només s'obté fent extraccions amb metanol, es prioritza que els altres pics són més extensos utilitzant etanol.

Taula 8. Àrees dels principals pics de les extraccions amb etanol i metanol.

Solvent		Pic									
Àrea	Cromatograma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Metanol	1796	36	222	31	56	2	19	13	242	87
	Etanol	1793	40	150	176	65	135	21	33	291	123

Es va proposar tindre en compte el percentatge de solvent orgànic, llavors, un cop definit quin es faria servir, s'han fet extraccions amb etanol al 80% i amb etanol al 60%. En la figura 15 es mostren els dos cromatogrames superposats.

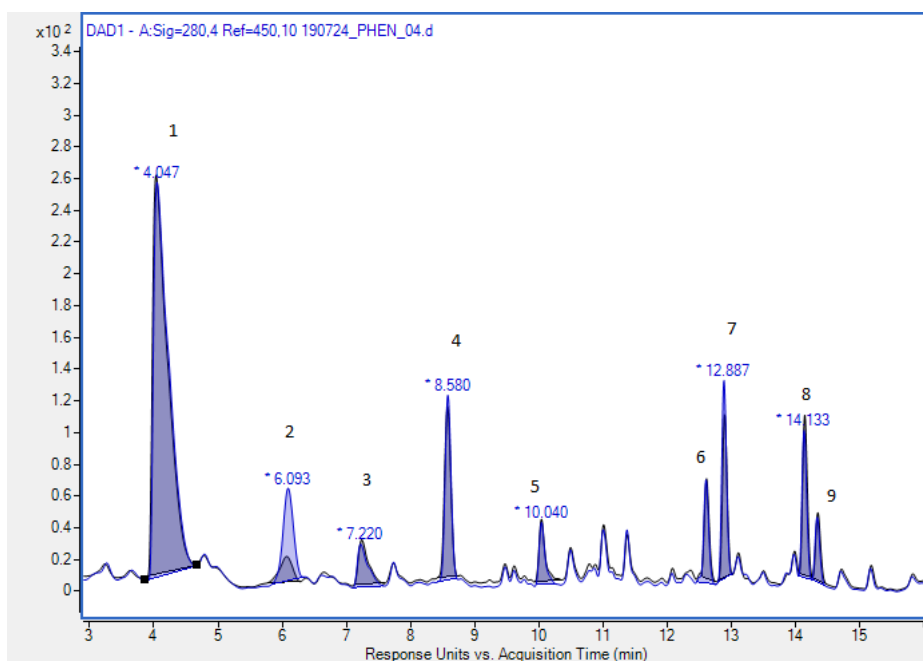


Figura 15. Cromatogrames d'extraccions amb etanol al 80% i 60%. El cromatograma blau correspon a l'extracció amb etanol 80%, el cromatograma negre correspon a l'extracció amb etanol 60%

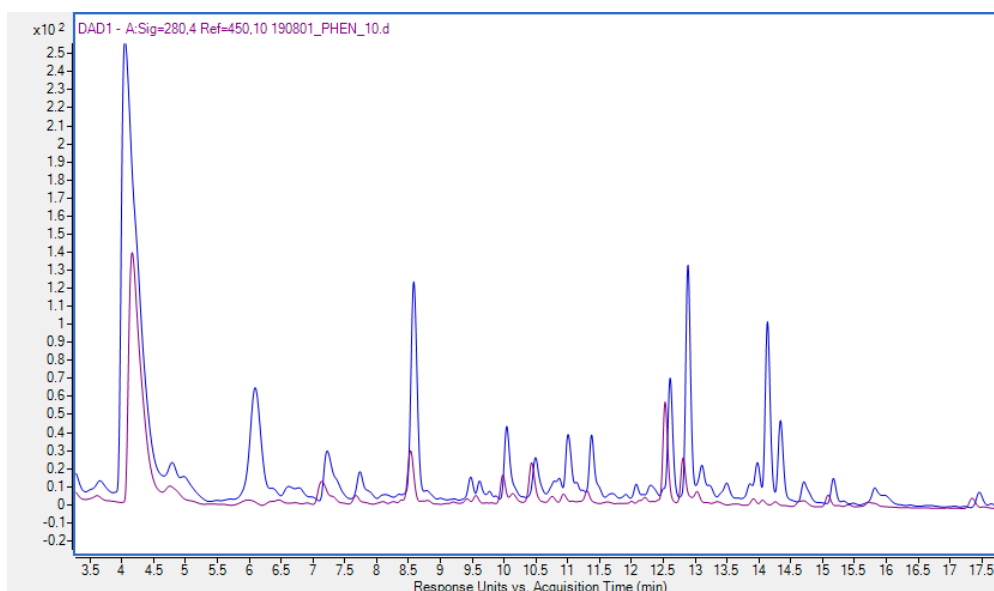
Tal com es mostra a la taula 9, les diferències són molt poc significatives. Hi ha algun pic de l'extracte amb etanol al 80% és més gran però poc representatiu.

Es decideix treballar amb etanol al 80% ja que el pas posterior a l'extracció, quan s'ha d'eliminar el solvent, és molt més senzill quan hi ha menys quantitat d'aigua degut a que a més quantitat d'aigua més costa eliminar el solvent al rotavapor.

Taula 9. Àrees dels pics de les extraccions amb etanol al 60% i 80%.

% Solv.		Pic								
Àrea	Cromatograma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Etanol 60%	4094	222	294	734	262	326	522	517	222
	Etanol 80%	4121	664	309	761	255	354	640	474	211

A partir d'aquest punt, es treballa només amb matriu liofilitzada, comporta més temps liofilitzar la mostra però tenen grans quantitats d'aigua i les diferències són molt significatives. En la figura 16 es mostren dos cromatogrames superposats que provenen de dos extraccions de la mateixa matriu A, en els dos casos es va pesar 1 gram de mostra a la cel·la del ASE. Com es pot veure hi ha grans diferències degut a que són matrius amb una elevada quantitat d'aigua.

**Figura 16.** Cromatogrames de extraccions de matriu A fresca i liofilitzada. El cromatograma de color blau correspon a l'extracció de matriu liofilitzada, el cromatograma de color lila correspon a l'extracció de matriu fresca.

Molts articles sobre extraccions d'aquests compostos en les mateixes matrius utilitzen altres mètodes d'extracció. Un cop s'aconsegueix definir les condicions òptimes del ASE (Etanol 80%, 40°C), es vol comparar amb aquests altres mètodes per veure quin és més efectiu.

Amb la mateixa matriu A (degut a que C i D són de característiques molt similars) es compara amb els mètodes d'ultrasons i agitació magnètica. Es compara tant el tall del vegetal com la fulla d'aquest.

A la figura 17 s'observen els cromatogrames de cada una de les extraccions, totes, emprant la mateixa quantitat de mostra, 1 g.

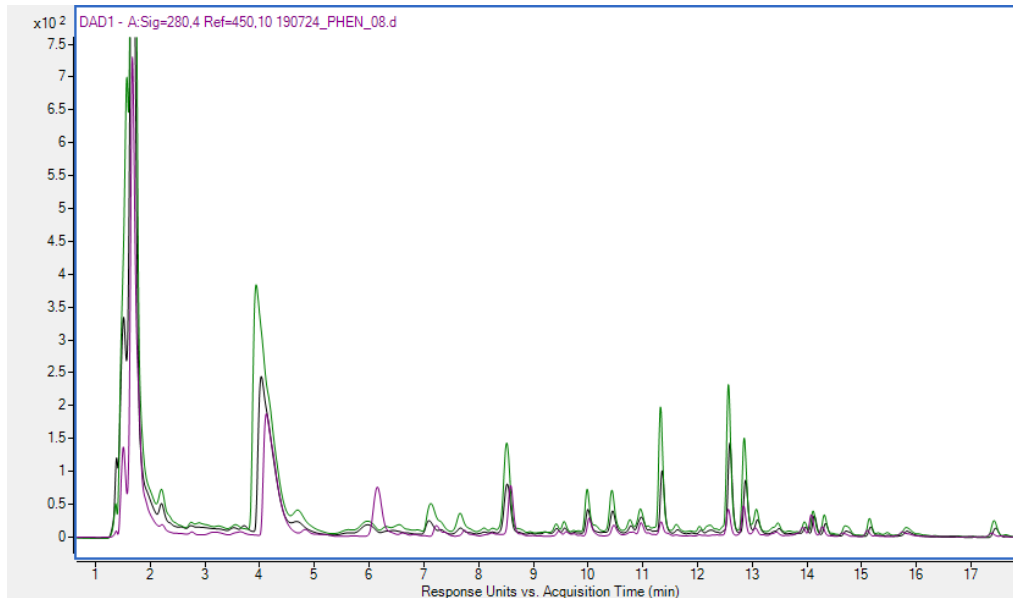


Figura 17. Cromatogrames de extraccions de matriu A per ASE, ultrasons i agitació magnètica. El cromatograma de color verd correspon a l'extracció per ASE, el cromatograma de color marró correspon a l'extracció per agitació magnètica i el cromatograma lila correspon a l'extracció per ultrasons.

El cromatograma de color verd correspon a l'extracció per ASE, el marró a l'extracció per agitació magnètica i el lila per ultrasons.

S'observa clarament com el mètode més efectiu és per ASE ja que tenim àrees de pics més grans tal com indica la taula 10. La figura 18 indica quins pics han estat seleccionats per valorar quina extracció és millor.

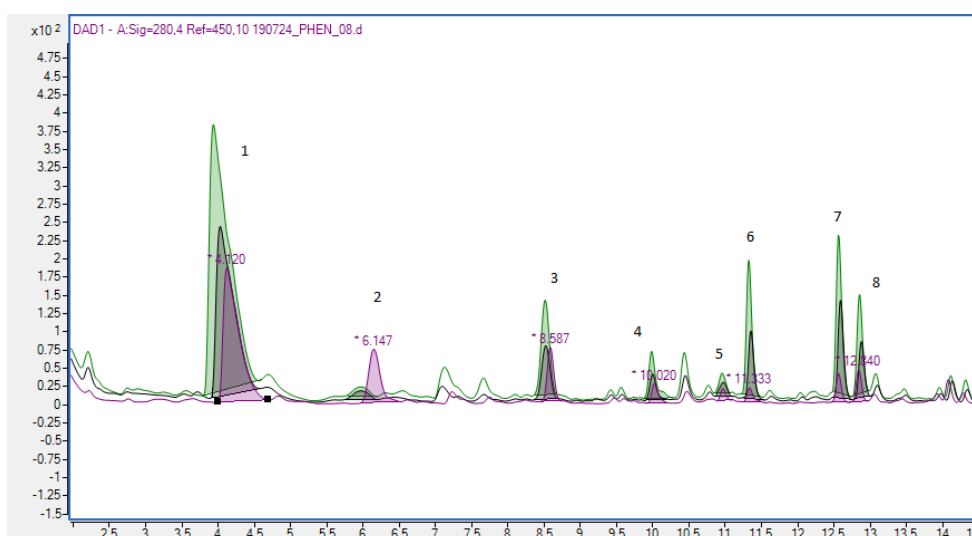


Figura 18. Pics integrats dels cromatogrames de les extraccions per ASE, ultrasons i agitació magnètica del tall de la matriu A. El cromatograma de color verd correspon a l'extracció per ASE, el cromatograma de color marró correspon a l'extracció per agitació magnètica i el cromatograma lila correspon a l'extracció per ultrasons.

Valorant la repetibilitat del mètode i la complexitat del mateix, el ASE segueix sent el millor mètode ja que es poden fer fins a 6 extraccions a la vegada en 5 hores aproximadament, i de manera automàtica. Tampoc es necessita gran quantitat de mostra. La mostra, roman dins de la cel·la on es protegeix de la llum i de contaminants externs, fet important degut a que els polifenols descomponen amb la llum. La taula 10 mostra el valor de les àrees dels pics seleccionats.

Taula 10. Àrees dels cromatogrames de les extraccions per ASE, ultrasons i agitació magnètica del tall de la matriu A.

Àrea	Cromatograma	Pic							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Ultrasons	2779	799	461	164	83	104	204	226
	Agitació magnètica	3839	170	587	218	135	493	721	401
	ASE	6963	179	1019	447	166	990	1167	728

La comparació s'ha fet també amb la fulla de la matriu A per acabar de confirmar quina de les extraccions és més efectiva. A la figura 19 es pot veure els tres cromatogrames superposats corresponents a les extraccions per ASE (vermell), agitació magnètica (marró) i per ultrasons (blau).

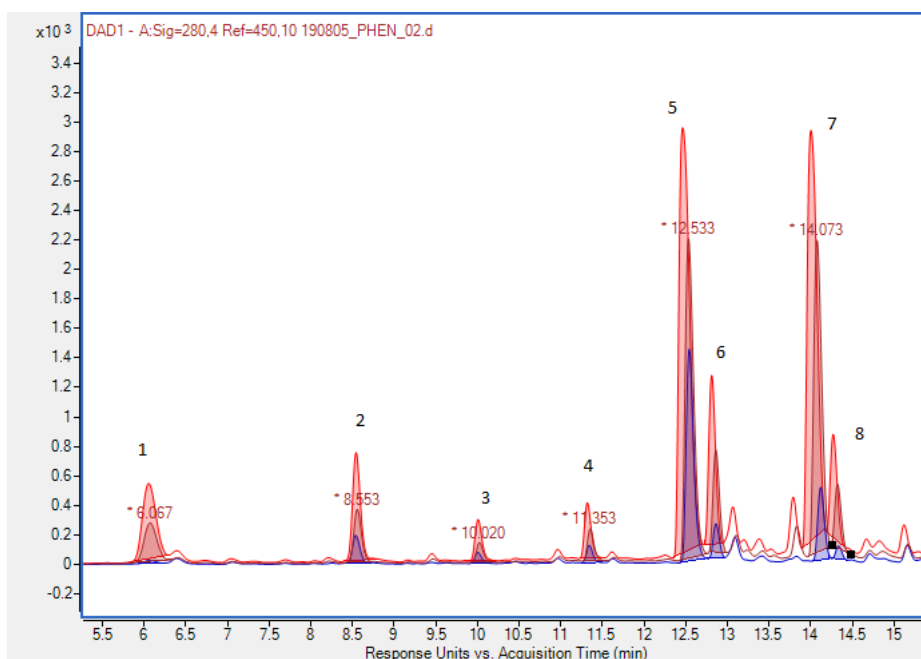


Figura 19. Cromatogrames corresponents a extraccions de la fulla de la matriu A per ASE, ultrasons i agitació magnètica.

Tal i com mostra la taula 11, la fulla del vegetal segueix el patró del tall. Per tant, es confirma l'ASE com a millor mètode d'extracció.

Taula 11. Àrees integrades dels pics de les extraccions de la fulla de la matriu A.

Fulla		Pic							
Àrea	Cromatograma	1	2	3	4	5	6	7	8
	ASE	5719	4793	1617	2096	25801	6420	22805	3925
	Ultrasons	191	1149	423	617	9051	1157	2721	437
	Agitació magnètica	2760	2287	797	1164	15201	3704	14145	2262

La matriu B, a diferència de les altres matrius A, C i D, té unes característiques diferents, per tant, es compara també l'extracció per ASE, amb el mètode d'extracció utilitzat a diferents articles^{8,10}, aquest mètode és mitjançant ultrasons.

La figura 20 mostra els cromatogrames superposats de les diferents extraccions. Com es pot observar els pics 4 i 5 tenen una concentració molt elevada, corresponen a pics de hesperidina i eriocitrina que són els majoritaris en aquesta matriu. Al tindre les concentracions tan elevades no es veuen diferències. Si que s'observen per als punts 1, 2 i 3 els quals s'obté major recuperació per a l'extracció mitjançant ASE.

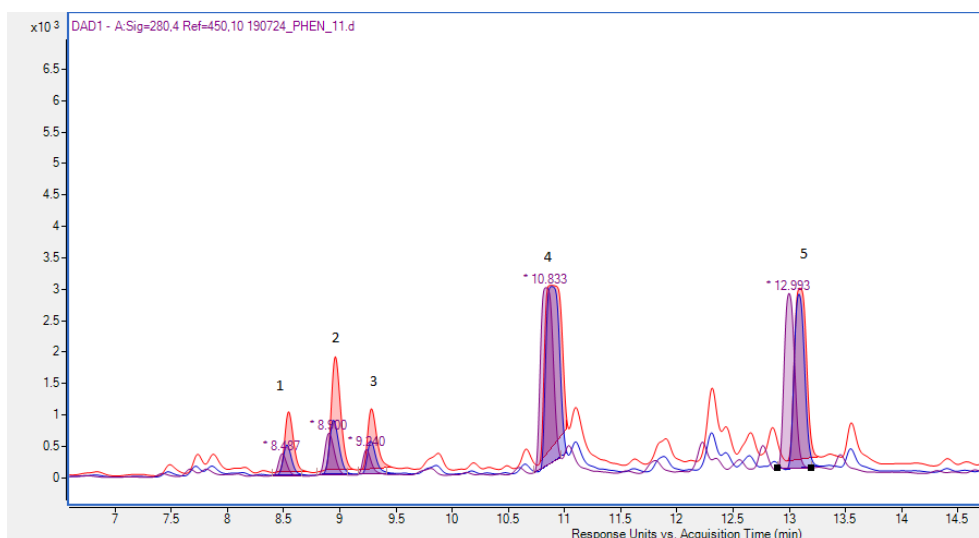


Figura 20. Cromatogrames superposats de diferents extraccions per a la matriu B. El cromatograma de color vermell correspon a l'extracció per ASE, el cromatograma de color blau correspon a l'extracció per agitació magnètica i el cromatograma lila correspon a l'extracció per ultrasons.

A la taula 12, els valors de les àrees del cromatograma de la figura 16. Es confirma l'ASE com a millor mètode d'extracció.

Taula 12. Àrees dels cromatogrames de les diferents extraccions per a la matriu B.

Matriu B		Pic				
Àrea	Cromatograma	1	2	3	4	5
	ASE	5064	10278	5479	26204	20152
	Agitació magnètica	2470	5010	2819	23130	18024
	Ultrasons	1837	3975	2038	21645	18093

Identificació dels pics:

Per a la identificació dels pics es treballa amb el software del MS: "Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00". Els principals pics obtinguts al DAD es comparen amb els pics del ESI extrets del MS, s'ha vist, a partir dels patrons, que hi ha una diferència de 0.14 min entre els pics DAD i ESI, per tant es basa en buscar pics que coincideixen en aquest temps de retenció i tinguin un score com a mínim del 80%, també es buscarà a la bibliografia si el compost identificat pot estar a la matriu. El software no només troba un sol compost per pic, per tant la identificació es orientativa ja que el pic pot correspondre a una sèrie de compostos diferents, els quals tenen el mateix score.

Matriu A:

El cromatograma de la figura 21 correspon a l'extracció de la matriu A amb les condicions òptimes, s'observen 8 pics molt clars que s'identifiquen gràcies al detector MS. Els compostos identificats es mostren a la taula 13.

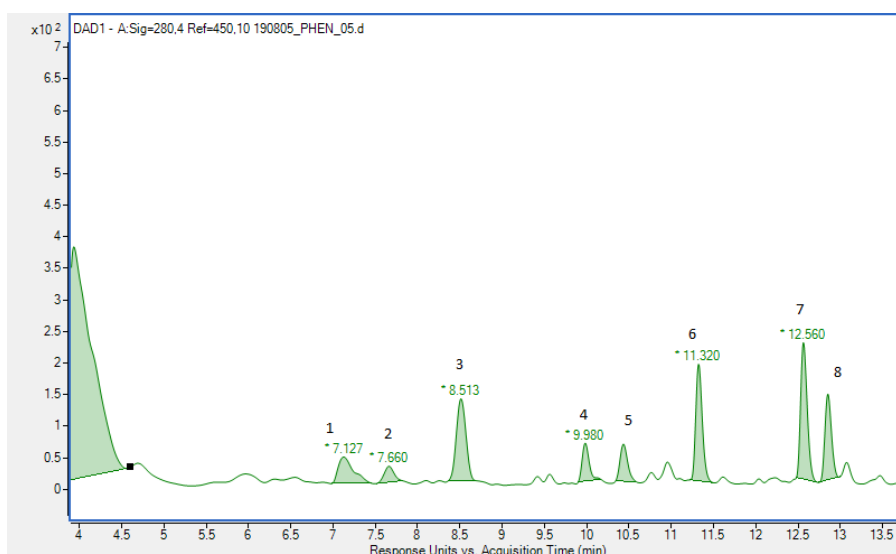


Figura 21. Cromatograma de l'extracció amb condicions òptimes de la matriu A.

Tal com mostra la següent taula 13 alguns pics no son inequívocament identificats pel software ja que es proposen diferents analits amb scores molt semblants. En el cas que es pugui, per a la completa identificació s'haurien d'analitzar els patrons corresponents i confirmar el temps de retenció.

També es podria fragmentar la mostra amb equips de espectrometria de masses en tàndem i avaluar el patró de fragmentació.

Es molt difícil identificar els pics degut a que poden correspondre a diferents compostos, com per exemple el pic 8 que pot correspondre a diferents polifenols d'interès.

Taula 13. Identificació orientativa dels principals pics de la matriu A.

Pic	DAD (Tr)	TOF (Tr)	Dif.	Àrea DAD	Compost	Score
1	7.127	7.265	0.138	522.99	Ferulic acid 4-sulfate	96.44
2	7.66	7.809	0.149	203.44	1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-1,3-dicarboxylic acid	83.99
3	8.513	8.651	0.138	1019.69	Veranisatin B	98.51
					Gentiopicrin	98.51
					1-O-2'-Hydroxy-4'methoxycinnamoyl-b-D-glucose	98.51
					1-O-Feruloylglucose	98.51
					1-O-Feruloyl-b-D-glucose	98.51
4	9.98	10.127	0.147	343	Sedoheptulose	99
					Cariose	99
					a-D-Mannoheptulopyranose	99
	10.127	0.147	343	Veranisatin B	98.7	
				Gentiopicrin	98.7	
				1-O-2'-Hydroxy-4'methoxycinnamoyl-b-D-glucose	98.7	
				1-O-Feruloylglucose	98.7	
1-O-Feruloyl-b-D-glucose	98.7					
5	10.433	10.577	0.144	363.91	9-Methyluric acid	94.04
					Allopurinol	94.04
					Hypoxarthise	94.04
6	11.32	11.471	0.151	990.8	3-Methylellogic acid 2-(4-galactosylglucoside)	98.26
7	12.56	-	-	1167.4	No peaks found	-
8	12.853	12.988	0.135	728.84	Apigenin 7-[galactosyl-(1->4)-mannoside]	98.65
					Isorhamnetin 3-O-a-L-arabinopyranoside 7-O-a-L-rhamnopyranoside	98.65
					Kaempferol 3-O-glucosyl-(1->2)-rhamnoside	98.65
					Kaempferol 4'-glucoside 7-rhamnoside	98.65
					Luteolin 7-neohesperidoside	98.65

Matriu B:

La segona matriu és molt rica en hesperidin i eriocitrin segons la bibliografia^{8,10,18}. En el cromatograma de la figura 22 podem veure 5 pics molt clars, i tal i com descriu la taula 14 s'identifiquen els dos pics 4 i 5 com eriocitrin i hesperidin. El fet de que aquests compostos es trobin en forma lliure, facilita tant la identificació dels pics com la quantificació dels compostos. La figura 18 mostra un cromatograma molt net, això es degut a una prèvia dilució de l'extracte degut a les altes concentracions de eriocitrina i hesperidina.

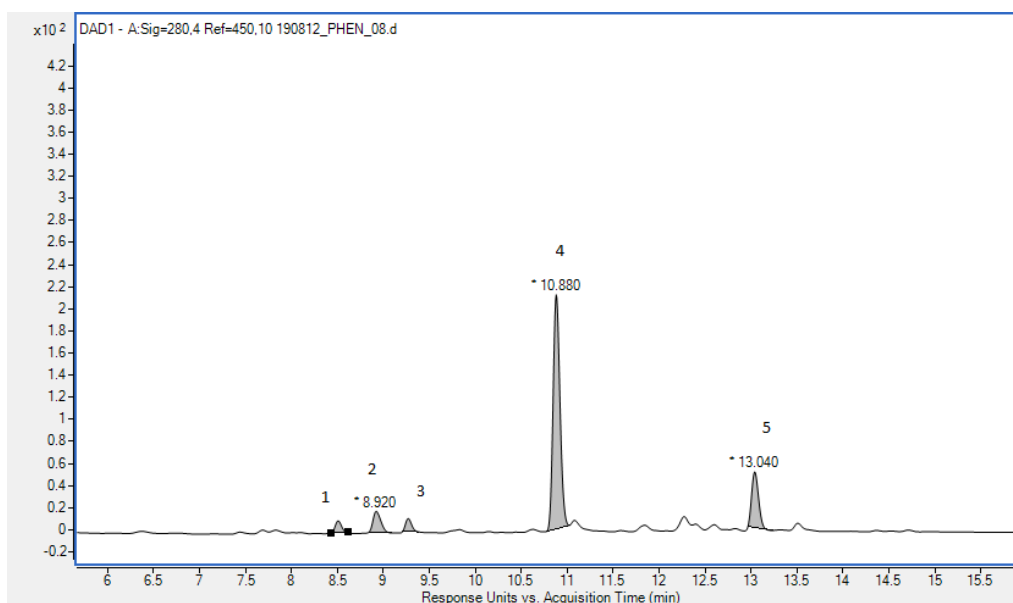


Figura 22. Cromatograma de l'extracció amb condicions òptimes de la matriu B. El pic 4 correspon a l'eriocitrina i el pic 5 correspon a l'hesperidina

La següent taula mostra els temps de retenció de cada pic seleccionat del DAD amb el compost identificat, es pot veure com s'identifica de manera molt clara la hesperidina i la eriocitrina.

Taula 14. Compostos identificats de la matriu B.

Núm Pic	Tr (DAD)	Tr (TOF)	Àrea Pico (DAD)	Dif.	Compost	Score
1	8.507	8.65	54.04	0.143	1,8-Dihydroxymethylanthraquinone 1,8-Di-O-b-D-glicoside	98.8
					1-hydroxy-3-methoxy-7-prineverosyloxanthone	
					2'-Hydroxydaidzein 4',7-diglucoside	
					6-C-glucopyranosyl-8-C-galactopyranosylapigenin	
					Apigenin 7-[galactosyl-(1->4)-mannoside]	
					Isorhamnetin 3-a-L-arabinopyranoside-7-O-a-rhamnopyranoside	
					Kaempferol-3-O-glucosyl-(1->2)-rhamnoside	
					Kaempferol-4'-glucoside 7-rhamnoside	
					Luteolin-7-neohesperidoside	
2	8.92	9.056		0.136	No compounds found w/ score over than 80%	
3	9.273	9.412	51.86	0.139	3,8-Diglucosyldiosmetin	98.9
					6,8-Diglucosyldiosmetin	
					Apigenin-6-C-glucoside-8-C-arabinoside	
					APIIN	
					Apigenin-7-neohesperidoside	
					Isorhamnetin 3-glucoside-4'-rhamnoside	
					Isorhamnetin 3-O-[b-D-glucopyranosyl-(1->2)-a-L-rhamnoside	
					Isorhamnetin 3-O-[b-L-rhamnofuranosyl-(1->6)-D-glucopyranoside	
					Kaempfrutin	
					Kaempferol-3-arabinofuranoside-7-rhamnofuranoside	
					Kaempferol-3-rhamnoside-4'-xyloside	
					Kaempferol-3-rhamnoside-7-xyloside	
4	10.88	11.025	1102.3	0.145	Eriocitrin	99.8
5	13.04	13.183	259.34	0.143	Hesperidin	99.1

Matriu C1:

La identificació de la matriu C1 es més complexa degut a que els analits estan units a un sucre, per tant no ens surt el compost lliure com a la matriu B, aquest fet complica molt la identificació. La figura 23 mostra el cromatograma que pertany a l'extracte amb les condicions òptimes de la matriu C1.

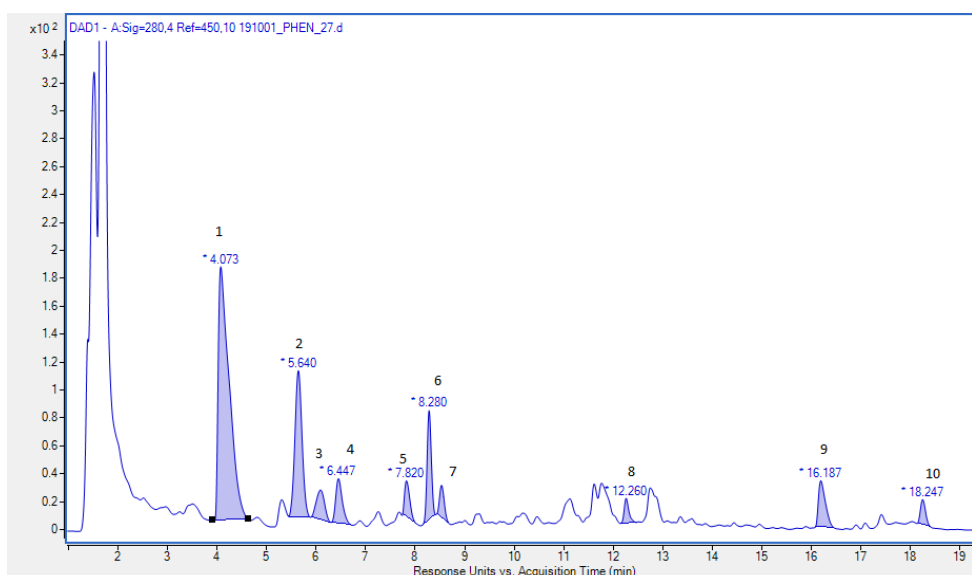


Figura 23. Cromatograma de l'extracció amb condicions òptimes de la matriu C1.

Tal i com mostra la taula 15, existeixen molt compostos possibles per a un mateix pic del DAD. Aquest pic (8) correspondrà a la quercetina i es quantificarà en funció d'equivalents al patró lliure.

Taula 15. Compostos identificats de la matriu C1.

Núm. pic	DAD	TOF	Dif.	Compost	Score
1	4.073	-			
2	5.64	5.786	0.146	Todatriol glucoside	97.28
				Oleoside dimethylester	97.44
				Loganic acid	97.19
				Citrusin E	97.17
3	6.087	6.229	0.142	1-O-Caffeoylquinic acid	80.19
				5Z-Caffeoylquinic acid	80.19
				Biflorin	80.19
				Cis-5-Caffeoylquinic acid	80.19
				Dihydroferulic acid 4-O-glicuronide	80.29
				Veranisatin C	80.29
4	6.447	6.59	0.143	3-Hydroxycharicol 1- [rhamnosyl-(1->6)-glucoside]	99.3
				Deoxynivaenol-3-glucoside	99.3
				Eugenol O-[α -L-Arabinofuranosyl (1->6)- β -D-glucopyranoside]	99.3
5	7.82	7.976	0.156	Quinoxaline-2-carboxylic acid	96.85
				Porric acid A	95.85

				Hesperetin	95.85
				Haemetoxylin	95.85
				Folerogenin	95.85
				Ferreirin	95.85
6	8.28	-			
7	8.533	-			
8	12.26	12.398	0.138	Quercetin 3-O-(6-O-malonyl- β -D-glucoside)	98.95
				Gomphenol 3-methylether 4'-glucuronide	98.89
				3-Methylellagic acid 8-(3-acetylramnoside)	98.89
		12.399	0.139	Quercetin 4'-glucoside	98.29
				Quercetin 3-O-glucoside	98.29
				Quercetin 3-galactoside	98.29
				Quercetin 3-O-(6''-acetyl-glucoside)	98.37
9	16.18 7	-			
10	18.24 7	18.38	0.133	Sesartemin	96.81
				Cubebimore	96.81

Matriu C2:

En aquesta matriu, s'observa el mateix problema que a l'anterior. Es complica la identificació degut a que es troba la quercetina en forma de glucòsid. A la figura 24 s'observa el cromatograma corresponent a la extracció dels compostos bioactius en les condicions òptimes.

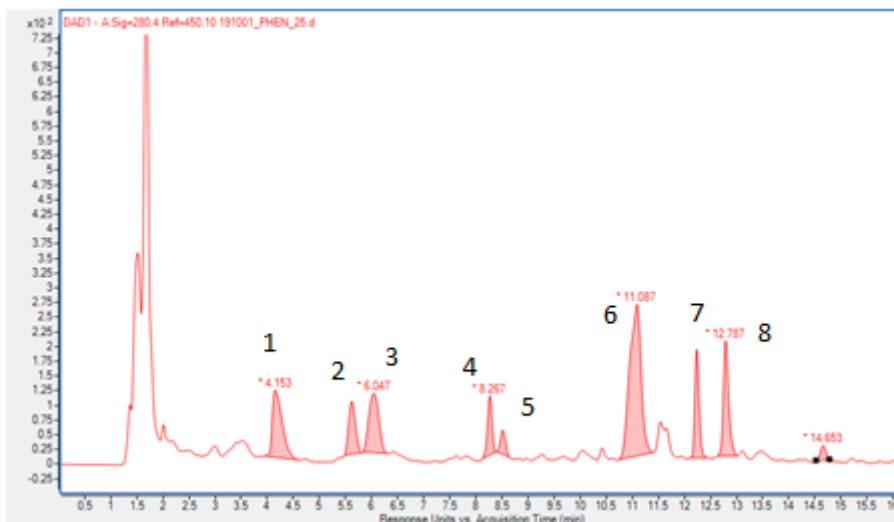


Figura 24. Cromatograma de l'extracció amb condicions òptimes de la matriu C2.

La taula 16, mostra els compostos identificats.

Taula 16. Compostos identificats de la matriu C2.

Núm. Pic	DAD	TOF	Dif.	Compost	Score
1	4.153	4.335	0.182	5-Hydroxydopamine	95.61
				Aziridyl benzoquinone	96.93
				Norepinephrine	95.61
				Pyridoxine (Vit. B12)	95.61
2	5.62	5.759	0.139	Todatriol glucoside	94.31
				Syrinigrin	94.07
				Oleoside dimethyl ester	94.66
				Loganic acid	94.12
				Citrusin E	94.07
3	6.047	6.19	0.143	Thiolactonycin	88.51
				2-(methylthiomethyl)-3-phenyl-2-propenal	88.45
4	8.267	8.414	0.147	Sesaminol glucosyl-(1->2)-[glucosyl-(1->6)]glucoside	99.37
				Cis-p-coumaric acid 4-[apiosyl-(1->2)]glucoside	99.37
				2'-(E)-Feruloyl-3-(arabinosylxylose)	99.37
		8.419	0.152	more than 50 compounds w/ score 99.56	
5	8.513	8.64	0.127	Geniposide	96.09
				Linusitanarin	96.05
				Perilloside E	96.05
				Secologanin	96.09
				Verbenadin	96.09
	8.682	0.169	1-O-Feruloylglucose	96.45	
			1-O-Feruloyl-β-D-glucose	96.45	
			3-O-p-Coumaroylquinic acid	96.3	
			4-p-Coumaroylquinic acid	96.3	
			Gentiopicrin	96.45	
Veranisatin B	96.45				
6	11.087	11.196	0.109	Cis-caffeoyl tartaric acid	97.85
				Caferic acid	97.85
				2-O-p-Coumaroylitartaric acid	97.62
7	12.233	12.386	0.153	Quercetin 3-O-(6-O-manoyl-β-D-glucoside)	97.58
		12.386	0.153	Quercimeritrin	98.52
				Quercetin 4'-glucoside	98.52
				Quercetin 3-O-glucoside	98.52
				Quercetin-3-O-(6"-acetyl-glucoside)	98.6
				Quercetin 3-galactoside	98.6
				Myricetin 7-rhamnoside	98.6
				Glyphoside	98.6

8	12.787	12.929	0.142	1,3-Dicaffeoylquinic acid	98.25
				1,4-Di-O-caffeoylquinic acid	98.25
				Formononetin 7-O-glucoside-6"-O-malonate	98.25

Matriu D:

Per últim, a la matriu D no s'identifiquen gaires compostos, el pic més característic correspon a un glucòsid de la quercetina que s'identificarà en funció d'equivalents a la forma lliure. A la figura 25 s'observa el cromatograma del qual s'han identificat els pics.

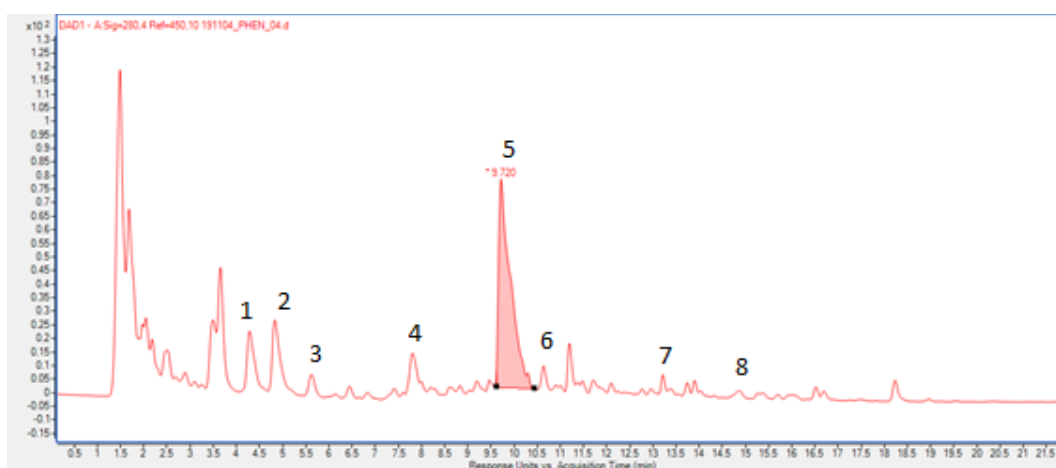


Figura 25. Cromatograma de l'extracció amb condicions òptimes de la matriu D.

La taula 17 mostra els principals compostos identificats. Tot i no trobar els compostos bioactius esperats, s'han identificat pics corresponents a altres compostos bioactius característics d'aquest vegetal⁹.

Taula 17. Compostos identificats de la matriu D.

Núm Pic	DAD	TOF	Dif.	Compost	Score
1	4.307	-			
2	4.82	4.996	0.175	Glucobrassicin	96.75
3	-				
4	7.773	7.921	0.148	Neoglucobrassicin	99.09
				4-Methoxyglucobrassicin	99.09
5	9.713	9.898	0.185	Quercetin-3-O-glucoside	95.21
6	10.622	-			
7	13.173	13.317	0.144	HMBOA-Glc	97.43
				Cyclodopa glucoside	97.43
				Cyclo-dopa 5-O-glucoside	97.43
				6"-O-Acetylholocalir	97.41
8	14.827	-			

Validació del mètode:

Per a la validació del mètode s'avaluaran diferents aspectes com: especificitat/selectivitat, linealitat, precisió, recuperació, límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ).

Selectivitat:

Al no poder arribar a la separació cromatogràfica dels pics del luteolin i quercetin, es decideix treballar amb solucions independents per aquests dos patrons, aconseguint així una bona selectivitat.

Tal i com mostra la figura 26, s'aconsegueix una bona selectivitat del mètode per a la determinació dels patrons proposats.

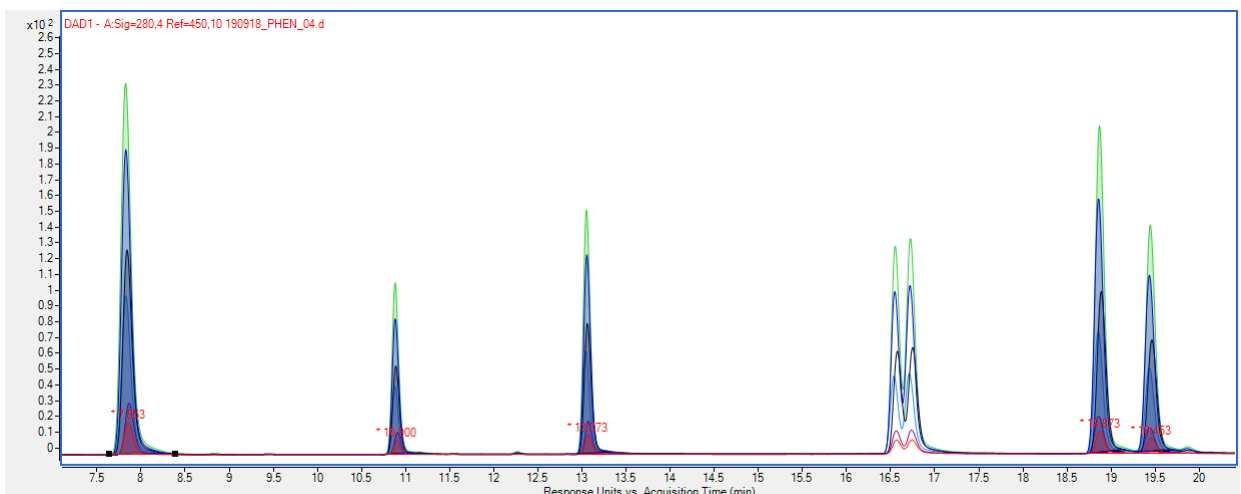


Figura 26. Cromatogrames superposats de la recta de calibratge.

Linealitat:

A la taula 18 es mostren els valors de R^2 on s'observa una bona linealitat ja que cap recta té un valor inferior al 0.99.

Taula 18. Rectes de calibratge amb el valor de R^2 .

Compost	Recta	
	Equació	R2
Àcid cafèic	$y = 34.074x - 34.395$	0.9962
Eriocitrina	$y = 9.9499x - 9.6581$	0.9962
Hesperidina	$y = 15.035x - 10.887$	0.9973
Apigenina	$y = 26.177x - 42$	0.992
Kaempferol	$y = 18.423x - 27.132$	0.9943

Limonina	$y = 5.2587x - 4.0309$	0.9952
Quercetina	$y = 81.948x - 25.18$	0.9998
Luteolina	$y = 23.494x - 8.9802$	0.9997

Es pot concloure que s'aconsegueix bona linealitat per a cadascuna de les rectes de cada patró.

Precisió:

Per valorar la precisió del mètode, s'integren els pics de les àrees corresponents a tres nivells de concentració, baix, mig i alt, tres repeticions al dia (intra-day) i durant 3 dies diferents (inter-day). Amb el valor de les àrees es calcula la desviació estàndard relativa (%RSD) de les diferents repeticions, en un mateix dia i a diferents dies. A la taula 19 es mostren els resultats.

Taula 19. Valors de %RSD dels diferents patrons.

Compost	Concentració	%RSD	
		Intraday	Interday
Àcid cafèic	1 ppm	9.61	2.12
	25 ppm	0.37	0.79
	45 ppm	1.11	0.67
Eriocitrina	1 ppm	11.16	3.89
	25 ppm	0.44	1.53
	45 ppm	1.75	1.76
Hesperidina	1 ppm	11.19	2.18
	25 ppm	5.49	7.34
	45 ppm	6.91	10.71
Apigenina	1 ppm	24.18	1.25
	25 ppm	19.95	5.00
	45 ppm	23.42	1.22
Kaempferol	1 ppm	10.61	11.46
	25 ppm	1.03	6.08
	45 ppm	1.17	0.86
Limonina	1 ppm	16.53	12.52
	25 ppm	11.65	4.06
	45 ppm	11.02	3.28
Quercetina	1 ppm	7.13	41.61
	25 ppm	10.83	21.48
	45 ppm	7.95	3.67
Luteolina	1 ppm	1.40	16.55
	25 ppm	10.17	0.59
	45 ppm	1.54	1.22

Com s'observa a la taula 19, en general, els valors de la desviació estàndard relativa no superen el 15%. Per l'àcid cafèic es mostren valors %RSD baixos, el valor més alt es per a concentracions petites, ja que és on els petits canvis, tenen conseqüències més notables. A diferents dies la desviació és molt baixa. El eriocitrina, kaempferol i luteolina segueixen la mateixa dinàmica. L'hesperidina, apigenina i limonina, mostren valors de desviació més alts en els assajos al mateix dia. Tenen una desviació més alta de concentracions en un mateix dia. En diferents dies no mostren tantes diferències, degut a que són relativament estables amb el temps. Per a la quercetina, els valors de %RSD són alts, en quant a assajos en diferents dies, mostra la inestabilitat del compost amb el pas del temps, a baixes concentracions aquestes variacions de composició són més notables, tal i com mostra el valor de %RSD = 41.61 a 1 ppm.

Recuperació:

La recuperació es determina fortificant cada matriu amb els patrons majoritaris en la matriu determinada. Es calcula dividint la concentració trobada amb l'esperada.

A la taula 20 s'observen els diferents valors mitjos de recuperació.

Taula 20. Recuperació dels diferents patrons a cada matriu.

Matriu	Patró	R%
A	Luteolina	32.26
	Apigenina	42.36
B	Hesperidina	91.95
	Eriocitrina	46.58
	Limonina	79.33
C1	Àcid cafèic	58.25
	Quercetina	-
C2	Àcid cafèic	60.40
	Quercetina	-
D	Kaempferol	-
	Quercetina	-

Com s'observa a la taula 20, s'obtenen valors molt baixos de recuperació per a la matriu A, això pot ser degut per la disposició d'aquests compostos a les matrius (en forma de glucòsid) i que els patrons reaccionin amb els sucres, formant un nou glucòsid. Com que les possibilitats són tan àmplies, és a dir, es poden formar molts glucòsids diferents, és

indetectable amb la resta de pics del cromatograma, per tant, l'àrea del patró disminueix i el patró que s'ha unit al sucre es troba en un altre temps de retenció indetectable perquè són moltes les possibilitats de formar-se glucòsids diferents. També és possible que els patrons que s'han afegit (en forma lliure) s'hagin perdut en algun punt de la metodologia.

Per a les matrius C i D, es pot veure com no tenim valors de recuperació, en excepció de l'àcid cafèic a la matriu C. Degut a que no ens surt cap pic detectable al mateix temps de retenció que el patró original. Pot ser que igual que a la matriu A, s'hagin unit a sucres i surtin a temps de retenció diferents i siguin indetectables degut a que com hi han tants glucòsids diferents possibles, les concentracions siguin molt baixes. També és probable que com que aquestes matrius tenen concentracions tan baixes de polifenols i per tant, hem de pesar més quantitat de mostra, es perdi més mostra durant l'extracció per diferents motius (mostra no dissolta, adherida a les parets del matràs, mostra perduda a les evaporacions, etc.)

No obstant això, per a la matriu B, s'obtenen valors molt bons de recuperació. Pot ser degut a que aquests compostos no es troben adherits a sucres de forma natural i que per tant, els patrons no s'adhereixin a cap sucre i surtin al temps de retenció corresponent. També, es pesa molta menys quantitat de mostra, pel que fa més simple que es produeixin menys pèrdues durant l'extracció ja que menys quantitat de mostra es pot dissoldre de forma més fàcil i hi haurà menys quantitat adherida a parets del matràs. Tot i així, es requereix més investigació al respecte per acabar de definir on es produeixen les pèrdues.

LOD i LOQ:

Per a valorar els límits de detecció i quantificació, disminuïm la concentració de les solucions dels patrons fins a que aquests no siguin detectables, és a dir, fins que no es distingeixi el pic del soroll de fons. El límit de detecció serà la concentració del patró on la relació senyal : soroll sigui 3. Per al límit de quantificació serà la concentració quan la relació senyal : soroll sigui 10. En la taula 21 es mostren els diferents límits de detecció i quantificació per a cadascun dels patrons.

Taula 21. LOD i LOQ dels patrons.

Patró	Tr	LOD	LOQ
Àcid cafèic	7.873	0.1	1
Eriocitrina	10.907	0.1	1
Hesperidina	13.06	0.1	1
Apigenina	18.86	0.1	1
Kaempferol	19.44	0.5	1
Limonina	23.44	0.8	1
Luteolina	16.613	0.1	1
Quercetina	16.747	0.001	1

Com es pot observar, tenim límits bastant baixos, el LOQ correspon al primer punt de la recta de calibratge. Canviar la longitud d'ona de treball de la quercetina ha suposat una disminució molt significativa del LOD ja que absorbeix molt més a 210 nm que a 280 nm.

Conclusions (català):

S'ha desenvolupat un mètode d'anàlisi per HPLC-DAD-TOF de compostos bioactius en quatre matrius vegetals, optimitzant les condicions de l'extracció i de la separació cromatogràfica. També s'han identificat els pics dels diferents cromatogrames de manera temptativa degut a que els compostos d'interès es troben en forma de glucòsid a la natura. Tot i així, el mètode desenvolupat permet la semi-quantificació d'aquests compostos en forma d'equivalents al patró lliure.

S'han obtingut diferents resultats per a cada matriu ja que no totes tenen la mateixa complexitat. Per exemple, per a la matriu B, que els compostos d'interès no es troben units a cap sucre, els resultats han sigut molt clars. Els analits surten al mateix temps de retenció que els patrons amb una bona resolució i eficàcia. La identificació d'aquests compostos també ha sigut molt clara i simple. A més, l'extracció ha donat valors de recuperació molt alts degut a l'alta concentració d'aquests compostos a la matriu.

Per una altre banda, per als altres vegetals, que tenen concentracions més baixes de polifenols, i a més, es troben en forma de glucòsid, la identificació, extracció i quantificació ha estat més complexa i ha necessitat més temps i treball obtenir els valors finals.

Cal mencionar que els compostos identificats per a cada matriu no sempre han coincidit amb els compostos majoritaris esperats a partir de la bibliografia.

En conclusió, identificar i quantificar els mateixos compostos en diferents matrius és una tasca molt complexa degut a la diferent disponibilitat dels analits en la matriu. Per tant, desenvolupar i optimitzar un sol mètode d'anàlisi per matrius amb característiques diferents, encara que siguin de la mateixa família de vegetals, té un valor afegit de dificultat.

Conclusions (English):

An analytical HPLC-DAD-TOF method for quantifying bioactive compounds in four matrices has been developed, optimizing extraction and chromatographic separation conditions. Also peaks from different chromatograms have been identified in a tentative way due to the glucoside structure of the interest compounds found in nature. Even so, the developed method allows the quantification of these compounds by standard equivalents.

Different results for each matrix has been obtained because each one has a different complexity. For instance, for matrix B, whose interest compounds are not attached to any sugar, results have been very clear. Its analytes appear at the same retention time as the standards with a great resolution and efficacy. Identification of these compounds has been also very clear and easy. Besides, extraction has performed high recuperation values due to the high concentration of the interest compounds in the matrix.

In the other hand, for the other vegetables, whose polyphenols are found in glucoside form and in a lower concentration, identification, extraction and quantification have been more complex and has needed more time and work to obtain the final results.

It is worth to mention that identified compounds for each matrix do not always match to the majority compound expected by the bibliography.

In conclusion, identify and quantify the same compounds in different matrices is a very complex task due to the different availability of the analytes in the matrix. Therefore, develop and optimize a unique analytic method for different matrices, even though they belong to the same group of vegetables, is a tough task to accomplish.

Bibliografia:

- (1) Anersen, Oyvind M.; Markham, Kenneth R.; *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor and Francis, Boca Raton, 2006.
- (2) Packer, Lester; Flavonoids and Other Polyphenols. In *Methods in enzymology*, Abelson, John N.; Simon, Melvin I.; Ed. Adversory Board: California, 2001. Vol. 335.
- (3) Gilbert, John; Z. Senyuva, Hamide; *Bioactive compounds in foods*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2008, pp 3-8.
- (4) Niessen, Wilfried M.A.; *Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry*, Taylor & Francis Group, Leiden, 2006; Vol. 97, pp 413-431.
- (5) Katz, Elena; Eksteen, Roy; Schoenmakers, Peter; Miller, Neil; *HandBook of HPLC*, Marcel Dekker, Inc., New Jersey, 1998, Vol. 78.
- (6) Liu, G.; Zhuang, L.; Song, D.; Lu, C.; Xu, X. Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. dulce Mill./Pers.). *J. Sep. Sci.* **2017**, *40* (2), 472-479. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600995>.
- (7) Bertin, R. L.; Gonzaga, L. V.; Borges, G. da S. C.; Azevedo, Mò. S.; Maltez, H. F.; Heller, M.; Micke, G. A.; Tavares, L. B. B.; Fett, R. Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* **2014**, *55*, 404-411. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.036>.
- (8) Becker, C.; Kläring, H. P.; Kroh, L. W.; Krumbein, A. Temporary reduction of radiation does not permanently reduce flavonoid glycosides and phenolic acids in red lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *72*, 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.006>.
- (9) Tuszyńska, M. Validation of the Analytical Method for the Determination of Flavonoids in Broccoli. *J. Hortic. Res.* **2014**, *22* (1), 131-140. <https://doi.org/10.2478/johr-2014-0016>.
- (10) Russo, M.; Bonaccorsi, I.; Inferrera, V.; Dugo, P.; Mondello, L. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fiber: Availability in orange's by-products. *J. Funct. Foods* **2015**, *12*, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.008>.
- (11) Blunder, M.; Orthaber, A.; Bauer, R.; Bucar, F.; Kunert, O. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. *Food Chem.* **2017**, *218*, 600-609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.077>.
- (12) Gomes, S. V. F.; Portugal, L. A.; dos Anjos, J. P.; de Jesus, O. N.; de Oliveira, E. J.; David, J. P.; David, J. M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem. J.* **2017**, *132*, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>.
- (13) Tsanova-Savova, S.; Ribarova, F. Flavonols and flavones in some bulgarian plant foods. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2013**, *63* (3), 173-177. <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0081-5>.
- (14) Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, *799* (1-2), 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01061-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01061-3).
- (15) Jeong, S. W.; Kim, G. S.; Lee, W. S.; Kim, Y. H.; Kang, N. J.; Jin, J. S.; Lee, G. M.; Kim, S. T.; Abd El-Aty, A. M.; Shim, J. H.; et al. The effects of different night-time temperatures and cultivation durations on the polyphenolic contents of lettuce: Application of principal component analysis. *J. Adv. Res.* **2015**, *6* (3), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.01.004>.
- (16) Khanam, U. K. S.; Oba, S.; Yanase, E.; Murakami, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of

- selected leafy vegetables. *J. Funct. Foods* **2012**, *4* (4), 979-987. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.07.006>.
- (17) Zhao, Z.; He, S.; Hu, Y.; Yang, Y.; Jiao, B.; Fang, Q.; Zhou, Z. Fruit flavonoid variation between and within four cultivated Citrus species evaluated by UPLC-PDA system. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. **2017**, *224* (October), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.038>.
- (18) Dong, X.; Hu, Y.; Li, Y.; Zhou, Z. The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [Citrus limon (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. **2019**, *243* (August 2018), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.036>.
- (19) Abu-Reidah, I. M.; Ali-Shtayeh, M. S.; Jamous, R. M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from Rhus coriaria L. (Sumac) fruits. *Food Chem.* **2015**, *166*, 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>.
- (20) Sultana, B.; Anwar, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.* **2008**, *108* (3), 879-884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053>.
- (21) Santos, W. N. L. dos; da Silva Sauthier, M. C.; dos Santos, A. M. P.; de Andrade Santana, D.; Almeida Azevedo, R. S.; da Cruz Caldas, J. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (Psidium guajava L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). *Microchem. J.* **2017**, *133*, 583-592. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.029>.
- (22) Barreca, D.; Gattuso, G.; Laganà, G.; Leuzzi, U.; Bellocco, E. C- and O-glycosyl flavonoids in Sanguinello and Tarocco blood orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck) juice: Identification and influence on antioxidant properties and acetylcholinesterase activity. *Food Chem.* **2016**, *196*, 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.098>.
- (23) Materska, M.; Olszówka, K.; Chilczuk, B.; Stochmal, A.; Pecio, Ł.; Pacholczyk-Sienicka, B.; Piacente, S.; Pizza, C.; Masullo, M. Polyphenolic profiles in lettuce (Lactuca sativa L.) after CaCl₂ treatment and cold storage. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245* (3), 733-744. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3195-0>.
- (24) Rybarczyk-Plonska, A.; Wold, A. B.; Bengtsson, G. B.; Borge, G. I. A.; Hansen, M. K.; Hagen, S. F. Flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) flower buds as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *116*, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.023>.
- (25) Kuppusamy, P.; Lee, K. D.; Song, C. E.; Ilavenil, S.; Srigopalram, S.; Arasu, M. V.; Choi, K. C. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop Lolium multiflorum using HPLC-DAD. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2018**, *28* (3), 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.006>.
- (26) C T, S.; Balachandran, I. LC/MS characterization of antioxidant flavonoids from Tragia involucrata L. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2016**, *5* (3), 231-235. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.06.001>.
- (27) Li, Z.; Lee, H. W.; Liang, X.; Liang, D.; Wang, Q.; Huang, D.; Ong, C. N. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. *Molecules* **2018**, *23* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051139>.
- (28) Bardakci, H.; Acar, E. T.; Kirmizibekmez, H. Simultaneous quantification of six flavonoids in four Scutellaria taxa by HPLC-DAD method. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2019**, *29* (1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.09.006>.
- (29) Avula, B.; Sagi, S.; Wang, Y. H.; Wang, M.; Gafner, S.; Manthey, J. A.; Khan, I. A. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Limonoids and Flavonoids in Seeds of Grapefruits, Other Citrus Species, and Dietary Supplements. *Planta Med.* **2016**, *82* (11-12), 1058-1069. <https://doi.org/10.1055/s-0042-107598>.